

**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**Modulação da resposta imune do hospedeiro por componentes da parede celular de *Cryptococcus neoformans*.**

**Samyra Mara Coelho Caxito**

**Brasília-DF**  
**2017**

**SAMYRA MARA COELHO CAXITO**

**Modulação da resposta imune do hospedeiro por componentes da parede celular de *Cryptococcus neoformans*.**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Anamélia Lorenzetti Bocca**

**Brasília-DF**

**2017**

**SAMYRA MARA COELHO CAXITO**

**Modulação da resposta imune do hospedeiro por componentes da parede celular do fungo *Cryptococcus neoformans*.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Aprovado em 10 de Março de 2017.

**Banca examinadora**

---

Presidente: Dr.<sup>a</sup>. Anamélia L. Bocca - UnB

---

Membro: Dr. Márcio José Poças Fonseca - UnB

---

Membro: Dr. Stephan Alberto Machado de Oliveira - Icesp

---

Suplente: Dr. Aldo Henrique F. P. Tavares – UnB/FCE

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a DEUS por me preparar e permitir seguir caminhos que um dia acreditei ser apenas sonhos; e por me guiar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Marcílio Caxito e Rosimere Caxito, pelo amor incondicional dedicado a mim, de forma tal, a desistirem dos seus sonhos para sonharem os meus.

À Fabiana Brandão, pessoa amiga e companheira, que sempre esteve ao meu lado, por me apresentar a essa realidade totalmente nova e diferente de tudo o que conhecia. Por sempre me apoiar nos momentos difíceis e por jamais me deixar desistir dos meus sonhos, pois sem ela essa jornada seria quase impossível.

À minha orientadora, Anamélia Lorenzetti, por acreditar em mim e por ter me dado a chance de desfrutar de todo esse conhecimento. Me inspiro, a cada dia, a ser metade da profissional que ela é, por ser sensível à situação dos outros e da magnífica capacidade em liderar.

Aos meus irmãos, Káthira Caxito e Renan Caxito, aos meus tios, Rogério Coelho e Neilton (“Gordo”) e à grande amiga da família, Neidinha, por todo apoio, mesmo que à distância.

À minha amiga, M<sup>a</sup>. Aparecida Yamauti (Bombom), por ser uma grande amiga de todos os momentos e de toda uma vida.

À minha segunda família, Gladys Brandão e Fábio Silva, Mariana Brandão e Thiago Narciso, Anna Brandão e Jeferson Vidal, Raul Brandão e Larissa Barbosa e a dona Gercila Brandão por serem pessoas maravilhosas e de tão alto-astrol em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos: Allan Brandão, Joseph Lucas, Giovanna Narciso, Gustavo Narciso e o caçulinha Gael Narciso, por me proporcionarem a dádiva de ser TIA e

desfrutar dos momentos mais importantes da vida de cada um. Amo vocês, meus pequeninos.

Aos colegas do laboratório: Márcio Jerônimo, Isaque Medeiros, Raffael Araújo, Karina Simon, Pedro Bürgel, Eduardo Carvalho; Angelina Moreschi, Paulo H. Veloso, Luciano Miranda, Narlla Verorrayne, Camille Florencio, Guilherme Silva, Gabriela Spolti, Dawanne Silva, Arthemina Sampaio, Mariana Miguel, Thaís Bergmann, Helena Ipê, pelos momentos descontraídos que transformaram nossa rotina em diversão. Com vocês a realização desse trabalho foi bem mais fácil e divertido. Sentirei falta!

Aos colegas da Biomol: Fernanda Guilhelmelli, Nathália Vilela, Marco Oliveira, Caliandra Souza, Sâmia Gomes, Larissa Bittencourt, Daniel Paiva, Prof.<sup>a</sup>. Lorena Derengowski, Prof. André Nicola, Prof.<sup>a</sup>. Patrícia Albuquerque e Prof.<sup>a</sup>. Ildinete Pereira pela ajuda nessa jornada, além dos jantares e farras. Vocês sabem, de fato, como transformar momentos chatos em algo super descontraído.

Aos professores, Aldo H. Tavares e Larissa Matos, pela ajuda na realização desse trabalho, mas principalmente, pelas conversas bobas e momentos divertidos.

Ao Prof. Márcio Poças, pelas noites de boa conversa e, principalmente, pela aventura em plena “nevasca” com direito a chuva de granizo e um frio terrível em Durham (NC) -EUA. Essa lembrança ainda promove boas risadas.

Aos demais colegas de outros laboratórios que, em algum momento, estiveram presentes nessa jornada.

Ao Chiquinho, pela sua disposição e prontidão em todos os momentos.

Aos servidores da secretaria do Programa da Pós, Alessandro e Isabela, pela disposição e atenção em todos os momentos que precisei.

E finalmente, à Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

*"Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem; e a segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre."*

*(Albert Einstein)*

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1 Termotolerância	18
1.2 Dimorfismo	18
1.3 Moléculas de Adesão	19
1.4 Receptores Hormonais	19
1.5 Produção de Enzimas	19
1.6 Cápsula e Componentes de Parede Celular	20
2. <i>C. neoformans</i>	22
2.1 Patologia – Criptococose	23
3. Interação dos componentes da parede celular com o sistema imune do hospedeiro	27
<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
Objetivo Geral	32
Metas	32
<b>METODOLOGIA</b>	<b>33</b>
1. Animais	33
2. Cultura Celular	33
3. <i>Cryptococcus neoformans</i>	34
4. Obtenção da Fração F1 da parede celular das linhagens H99, B3501 e <i>cap67Δ</i> do fungo <i>Cryptococcus neoformans</i>	35
5. Ativação dos Macrófagos estimulados com a fração F1	35
6. Dosagem de Citocinas	36
7. Dosagem de Óxido Nítrico	36
8. Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo	36
9. Ensaio de Fagocitose e Atividade Microbicida	37
10. Curva de sobrevivência	38
11. Quantificação de Citocinas no macerado de Pulmão	38
12. Análise Estatística	39

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
1. Frações F1 da parede celular de <i>Cryptococcus neoformans</i> induzem a ativação dos macrófagos murinos .....	40
2. As frações F1 da parede celular do fungo são capazes de induzir a produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos murinos .....	41
3. Aumento da capacidade fungicida dos macrófagos induzida pelas frações.....	42
4. As frações F1B e F1H não alteram a viabilidade celular .....	44
5. A fração F1B é capaz de aumentar a sobrevida dos animais infectados por <i>C. neoformans</i> .....	46
6. Dosagem das citocinas da resposta imune inata dos pulmões de camundongos .....	47
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>54</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da parede celular e cápsula dos fungos .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 2 – Estimativa anual de casos de criptococose em pacientes infectados pelo HIV no mundo .....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 3 – Ciclo de infecção do fungo <i>C. neoformans</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 4 – Prováveis vias utilizados pelo fungo <i>Cryptococcus</i> para o cruzar a barreira hematoencefálica .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 5 – Representação esquemática dos receptores de reconhecimento padrão (PRR) das células do sistema imune .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 6 – Produção de TNF-<math>\alpha</math> induzida por estímulos de diferentes concentrações das Frações F1 em macrófagos peritoniais .....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 7 – Produção de Óxido Nítrico (NO) em resposta a estímulos de diferentes concentrações das Frações F1 em macrófagos peritoniais .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 8 – Índice de fagocitose por macrófagos das leveduras da linhagem H99 de <i>C. neoformans</i> após estímulos com as frações .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 9 – Viabilidade celular de macrófagos peritoniais após estímulos com as frações F1 das linhagens de <i>C. neoformans</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 10 – O estímulo com a fração FB3501 confere aos animais maior tempo de sobrevida .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 11 – Dosagem de citocinas do macerado do pulmão de animais previamente estimulados com a fração F1B e posteriormente infectados com a linhagem H99 de <i>C. neoformans</i> .....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**%:** Porcentagem

**°C:** Graus Celsius

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**BMDC:** Macrófagos Derivados de Medula Óssea

***C. neoformans:*** *Cryptococcus neoformans*

**CFU:** Unidade Formadora de Colônias

**CLR:** Receptores do tipo Lectina

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de Carbono

**DCs:** Células Dendríticas

**ELISA:** Ensaio de ligação imunoenzimático

**NO:** Óxido Nítrico

**F1:** Fração 1

**FB:** Fração 1 da Linhagem B3501

**FC:** Fração 1 da Linhagem acapsular *cap67Δ*

**FH:** Fração 1 da Linhagem H99

**GalXM:** Galactoxilomanana

**GM-CSF:** Fator de Crescimento de Granulócitos e Macrófagos

**GXM:** Glucuronoxilomanana

**HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês - *Human Immunodeficiency Virus*)

**IL:** Interleucina

**INF-γ:** Interferon Gama

**K<sup>+</sup>:** Íon Potássio

**kDa:** kilodalton

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**MAT:** *Mating Type*

**Mm:** Milimolar

**mL:** Mililitros

**μL:** Microlitros

**μm:** Micrômetro

**μM:** Micromolar

**MOp:** macrófago peritoneal

**NaOH:** Hidróxido de Sódio

**ng:** nanograma

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Nitrito

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** Nitrato

**NOD:** Receptores do tipo Nod

**PAMPs:** Padrões moleculares associado a patógenos

**pH:** Potencial Hidrogeniônico

**PRRs:** Receptores de reconhecimento padrão

**PBS:** Tampão Fosfato Salina

**pg:** Picograma

**rpm:** Rotações por minuto

**RPMI:** Meio Roswell Park Memorial Institute

**SFBi:** Soro Fetal Bovino Inativado

**SI:** Sistema Imune

**SIDA:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**Th:** Linfócito T Auxiliares

**TLR:** Receptores do tipo *Toll*

**TNF:** Fator de Necrose Tumoral

**xg:** Força Centrífuga Relativa

## RESUMO

A incidência de infecções fúngicas sistêmicas vem se elevando com o aumento de situações em que se observa supressão do sistema imune do paciente, tornando-se este, um problema de saúde mundial. *Cryptococcus neoformans* é um fungo cosmopolita e mundialmente distribuído, que se apresenta como uma levedura encapsulada, presente no ambiente, acometendo, especialmente, pacientes imunodeprimidos e apresentando índice de mortalidade acima de 60%.

Embora existam extensivos estudos sobre a estrutura capsular das leveduras do fungo *C. neoformans*, pouco se sabe sobre a interação deste patógeno com o hospedeiro, particularmente no que diz respeito aos componentes de sua parede celular. Estudos em algumas espécies de fungos vem apontando os componentes presentes na parede destes micro-organismos, como forte imunomodulador durante a interação patógeno-hospedeiro, podendo estes componentes serem empregados em estudos na elaboração de vacinas.

Nesse trabalho, foi avaliada a capacidade da fração 1 (F1) extraída da parede celular de diferentes linhagens de *C. neoformans* em modular a resposta imune do hospedeiro. Inicialmente, foram realizados ensaios *in vitro*, para avaliar a viabilidade celular de macrófagos de camundongo, empregando diferentes concentrações das frações, extraídas a partir das linhagens de *C. neoformans* H99, B3501 e da linhagem mutante *cap67* $\Delta$ . Em seguida, foi avaliada a capacidade das frações em induzir a produção de citocinas nas células do hospedeiro. Os dados mostram que, após 18 horas de interação, as frações das linhagens B3501 e *cap67* $\Delta$  induziram elevados níveis de TNF- $\alpha$ , demonstrando que há uma prévia ativação desses fagócitos sem alterar a viabilidade celular. Além disso, foi avaliado a atividade microbicida e de fagocitose de macrófagos previamente estimulados com essas frações, seguindo com interação com leveduras de *C. neoformans*. Os dados demonstram que, no intervalo de 24 horas após interação, houve uma diminuição significativa no número de leveduras recuperadas a partir dos macrófagos. Além disso, houve também um aumento significativo no número de leveduras fagocitadas. Nos testes *in vivo*, usando camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6, as frações foram previamente aplicadas nos animais, e em seguida os animais foram infectados com leveduras de *C. neoformans* H99. Os resultados mostram um aumento significativo na sobrevivência dos animais que receberam o tratamento com as frações

em relação aos não tratados. Em conjunto, esses resultados claramente sugerem que os estímulos realizados com a fração F1 da parede de *C. neoformans*, são capazes de imunomodular a resposta do hospedeiro, resultando em uma ação protetora contra a infecção a fúngica. Esses resultados abrem margem para possíveis alvos terapêuticos, além de contribuir com os estudos na elaboração de vacinas contra a infecção causada por *C. neoformans*.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus neoformans*, frações, modulação da resposta imune

## ABSTRACT

The incidence of systemic fungal infections has been aggravated by the increase in diseases that induce a suppression of the immune system, making it a global health problem. *Cryptococcus neoformans* is a globally distributed, cosmopolitan fungus that presents as an encapsulated yeast present in the environment, especially affecting immunosuppressed patients and showed a mortality rate above 60%.

Although there are extensive studies on the capsular structure, composed especially of polysaccharides involving the yeasts of *C. neoformans*, little is known about the interaction of this pathogen with the host, particularly with respect to the components of its cell wall. Studies in some species of fungi have pointed out the components present in the wall of these microorganisms, as a strong immunomodulator during pathogen-host interaction, and these components can be used in studies in the elaboration of vaccines.

In this study the captivity of the different fractions extracted from the cell wall of *C. neoformans* was evaluated in modulating the immune response of the host. Initially, *in vitro* assays were performed to assess the cell viability of mouse macrophages cultured with different concentrations of  $\beta$ -glucan fraction from H99, B3501 and a mutant strain *cap67 $\Delta$*  strains of *C. neoformans*. Following, it was investigated the ability of these fractions to induce cytokine production in host cells. The data show that after 18 hours interaction, the fractions of strains B3501 and *cap67 $\Delta$*  increased the TNF- $\alpha$  levels, showing that these fractions are able to activate the macrophage response without affecting the cell viability. Moreover, we evaluate the microbicidal and phagocytosis capacity of macrophages, previously stimulated with these fractions, during interaction with *C. neoformans* yeast. The data showed that after 24 hour of interaction, the number of yeasts recovered from macrophages was significantly decreased. Furthermore, there was a significant increase in the number of yeast phagocytosed. Mice treated with  $\beta$ -glucan fraction previously of *C. neoformans* infection showed a increased survival compared to the mouse not treatment. Taken together, these results clearly suggest that cell wall components is able to stimulate host immune response, resulting in an increased host immunity. These results open to the new therapeutic possibilities, beyond gives support on adjuvant therapeutic research during *C. neoformans* infections.

**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, fractions, modulate the host immune response

## I. INTRODUÇÃO

Atualmente, o número de espécies de fungos conhecida é subestimada, sendo apenas 6% e uma mínima parte classificada como patogênica (Haswksworth, 1991; Haswksworth, 2004; Revisado por Perfect, 2006). Os fungos patogênicos se encontram mundialmente distribuídos, tanto em ambientes terrestre quanto aquático, nas formas de esporos ou de hifas. Os fungos patogênicos humanos apresentam algumas características importantes para o desenvolvimento de doenças sistêmicas, como por exemplo o crescimento em temperatura acima de 35°C (Casadevall, 2005; Brunke *et al*, 2016).

Estes fungos podem ser classificados como fungos oportunistas ou fungos primários. Dentre eles destacam-se os das espécies *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.* e *Histoplasma spp.* (Chakrabarti, 2005; Romani, 2011). Alguns destes fungos encontram-se na microbiota do hospedeiro e somente em determinadas condições decorrentes da alteração homeostática orgânica, tais como os distúrbios do sistema imunológico, o desenvolvimento desses microrganismos é favorecido, ocasionando o surgimento da doença (Almeida, 2008).

Os fungos são seres eucariotos, unicelulares ou pluricelulares, aclorofilados e apresentam nutrição absorptiva, ou seja, se alimentam de nutrientes provenientes da decomposição de matérias orgânicas. Podem se reproduzir sexuadamente ou assexuadamente e apresentar diferentes formas (cilíndrica, esférica, alongada, entre outras), dependendo do local em que se encontram (Levinson, 2014).

No processo de colonização do organismo de hospedeiros mamíferos, os fungos se depararam com algumas condições diferentes das quais estavam acostumados no ambiente o que os forçou a desenvolverem certos atributos que possibilitassem a sua evasão aos ataques do sistema imune (SI) e à sua sobrevivência nos hospedeiros. Esses atributos são denominados fatores de virulência (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Faguy 2011; Romani 2011).

De modo geral, os principais fatores de virulência apresentados pelos fungos são a (1) termotolerância, o (2) dimorfismo, as (3) moléculas de adesão, (4) receptores hormonais, a (5) produção de enzimas e os (6) componentes da parede celular e cápsula (Kurokawa *et al.*, 1998; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Kristóf *et al.*, 2013).



### 1.1 Termotolerância

É definida como a capacidade de sobreviver e proliferar em temperaturas acima da temperatura ambiente. Acredita-se que pequenas diferenças na tolerância à temperatura pode influenciar o potencial patogênico de um micro-organismo, bem como a forma de doença apresentada pelo hospedeiro. A resistência a mudança de temperatura está diretamente relacionada às proteínas do choque térmico. Essas proteínas desempenham importante papel na adaptação às altas temperaturas e na transição da forma de micélio para levedura (Kurokawa *et al.*, 1998; Casadevall, 2007; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Kristóf *et al.*, 2013; Brunke *et al.*, 2016). A termotolerância é observado em alguns fungos, como *C. neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Sporothrix schenckii*. No caso do fungo *C. neoformans* var. *gattii* que apresenta dificuldade de crescimento em temperatura a 37°C, estes não foram capazes de induzir infecção em modelos experimentos *in vivo*, enquanto que os isolados de *C. neoformans* var. *neoformans*, que apresenta essa termotolerância, foram capazes de germinar e crescer a 37°C produzindo uma infecção fatal (Kurokawa *et al.*, 1998; Casadevall, 2007).

### 1.2 Dimorfismo

O dimorfismo é uma característica que possibilita o fungo alterar a sua forma saprofítica para a forma patogênica. Geralmente os fungos se apresentam na forma micelial no ambiente, e se diferenciam para a forma leveduriforme, que é a forma infectante mais comum. Acredita-se que fatores relacionados ao sistema imune do hospedeiro, nutricionais e temperatura estejam diretamente relacionados com essa alteração morfológica. É uma característica importante que favorece o estabelecimento da doença e ajuda o micro-organismo a suportar as agressões desencadeadas pelo hospedeiro (Kurokawa *et al.*, 1998; Casadevall, 2007; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Kristóf *et al.*, 2013; Brunke *et al.*, 2016). O dimorfismo está relacionado com alterações nos componentes da parede a serem expostos dependendo do ambiente em que estiverem inseridos. O fungo *P. brasiliensis* na forma de micélio apresenta predominância de  $\beta$ -(1,3)-glucana enquanto que na forma de levedura há uma mudança para o polissacarídeo  $\alpha$ -(1,3)-glucana o que confere maior resistência à resposta do sistema imune do hospedeiro e maior rigidez a parede celular (Kurokawa *et al.*, 1998; Casadevall, 2007; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Kristóf *et al.*, 2013; Brunke *et al.*, 2016).

### 1.3 Moléculas de Adesão

A adesão do micro-organismo aos tecidos do hospedeiro foi considerada o principal passo para a colonização e disseminação da doença no hospedeiro. Essa adesão, podendo ser do tipo célula-célula ou célula-matriz extracelular, foi observada em alguns fungos, como *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum* e *C. neoformans*, que apresentavam glicosfingolipídios, que são considerados receptores de adesão presentes na superfície celular - parede celular ou cápsula, permitindo a adesão fúngica aos tecidos do paciente (Kurokawa *et al.*, 1998; Mendes-Giannini *et al.*, 2006; Brunke *et al.*, 2016).

### 1.4 Receptores hormonais

Estudos demonstram que os hormônios do hospedeiro podem interferir diretamente no metabolismo fúngico e no dimorfismo celular. Estudos com *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que esse micro-organismo possui receptores para estradiol no citosol da célula fúngica. Os metabólitos fúngicos gerados se ligam competitivamente com os sítios de ligação do estradiol na levedura e com receptores de estrogênio, sugerindo que os hormônios podem alterar o metabolismo fúngico ou que as substâncias fúngicas podem afetar o metabolismo do hospedeiro. Esse mesmo receptor também foi encontrado no fungo *P. brasiliensis*, tanto na forma de micélio quanto de levedura. A taxa de incidência de infecção no gênero masculino é de 13 a 18 vezes maior do que no gênero feminino. Essa susceptibilidade pode estar relacionada as diferenças hormonais entre os dois gêneros, revelando que o hormônio feminino pode inibir a transição da fase de micélio para a forma de levedura, porém não afeta o crescimento da levedura (Kurokawa *et al.*, 1998; Casadevall, 2007; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Kristóf *et al.*, 2013; Brunke *et al.*, 2016)

### 1.5 Produção de Enzimas

Os fungos secretam diversas enzimas tais como as lipases, proteinases e fosfolipases que desempenham papel fundamental no metabolismo fúngico, além de estarem envolvido na patogênese da infecção de forma a causar dano tecidual ao hospedeiro e fornecer nutrientes necessários a manutenção do micro-organismo (Kurokawa *et al.*, 1998; Casadevall, 2007; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Kristóf *et al.*, 2013; Brunke *et al.*, 2016). Algumas proteínases desempenham papel na adesão

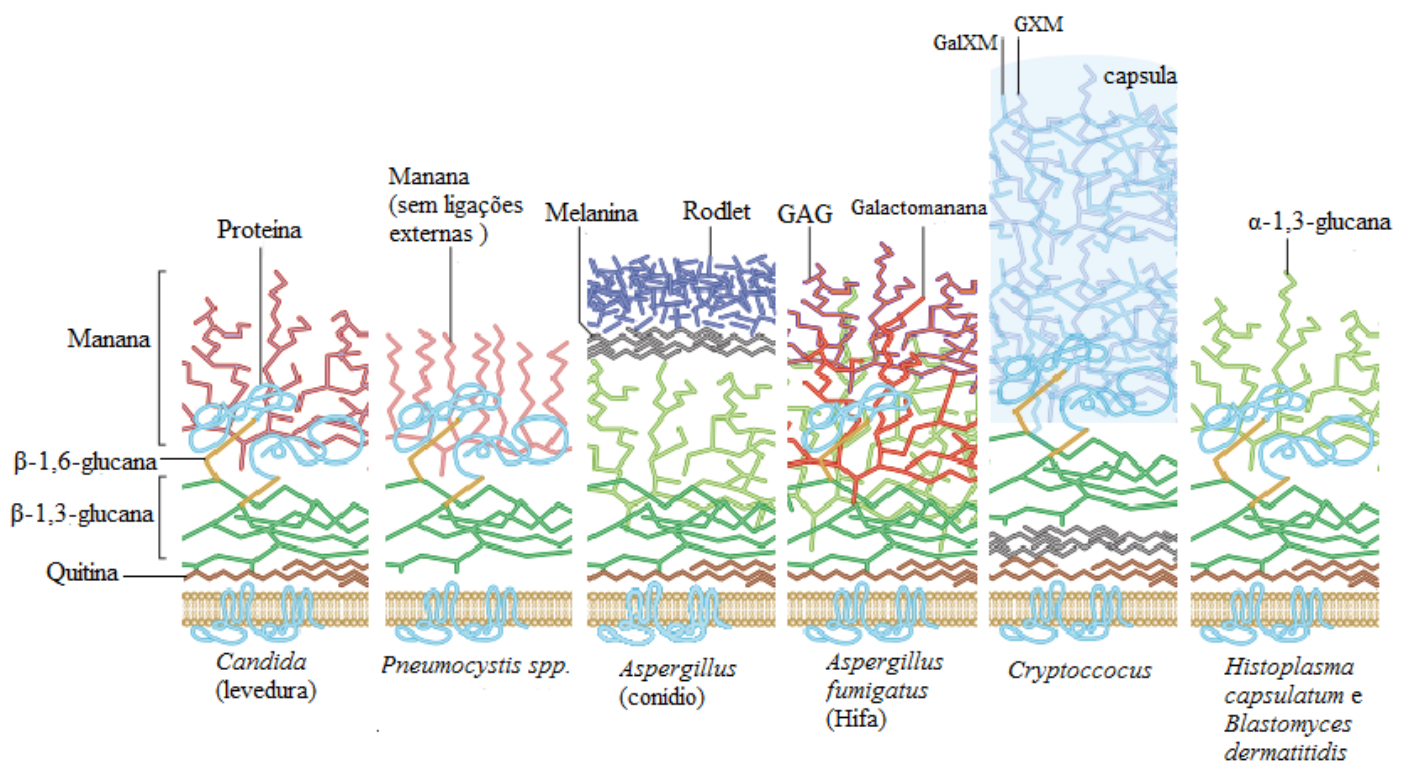
e sobrevivência do fungo nas superfícies das mucosas, invasão dos tecidos, digestão de moléculas do hospedeiro e na evasão. No caso de *C. neoformans*, algumas dessas enzimas têm a função de degradar proteínas plasmáticas humanas como a albumina, hemoglobina, queratina e imunoglobulina A (IgA) de forma a favorecer invasão dos tecidos do hospedeiro (Kurokawa *et al.*, 1998; Kwon-Chung e Varma, 2006; Casadevall, 2007; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Kristóf *et al.*, 2013; Brunke *et al.*, 2016).

### 1.6 Cápsula e componentes da parede celular

A cápsula e a parede celular são estruturas que conferem proteção ao micro-organismo contra a tentativa de eliminação pelo SI do hospedeiro, sendo, portanto, alvo principal de estudos (Brunke *et al.*, 2016). De forma geral, a parede celular dos fungos é composta, basicamente, por polímeros de carboidratos (glucanas) intercalados com glicoproteínas, quitina e mananas que conferem resistência e rigidez às células contra o estresse ambiental e a lise osmótica, permitindo manter a forma celular e promovendo a permeabilidade (Figura 1). Essa estrutura também é dinâmica e flexível, permitindo alterações morfológicas ocasionadas pelo acasalamento, brotamento e/ou outras interações celulares, possibilitando a transição dessas células em ambientes tão distintos. A quitina tende a predominar perto da membrana plasmática e acredita-se que a sua função seja proporcionar resistência estrutural à parede celular. As mananas são cadeias longas de manoses que, por muitas vezes, são adicionadas as proteínas fúngicas via N- ou O-ligações formando as manoproteínas, sendo facilmente encontradas na região mais externa da parede celular (Figura 1) (Bartinick-Garcia, 1968; Levitz, 2010; Kristóf *et al.*, 2013; Brunke *et al.*, 2016). As beta-glucanas formam a estrutura principal da parede apresentando quantidades variáveis e formas de disposição distintas: (1)  $\alpha$ -1,3-glucana, (2)  $\beta$ -1,3-glucana, (3)  $\beta$ -1,6-glucana ou associadas (4)  $\beta$ -(1-3)-(1-6)-glucana, que geralmente estão complexados com a quitina promovendo a manutenção e o fortalecimento da parede (Reese *et al.*, 2007; Doering, 2009; Levitz, 2010).

Já a cápsula é considerada uma estrutura extremamente dinâmica podendo crescer até várias vezes o diâmetro celular em espessura e com características imunogênicas e antigênicas. No ambiente externo, a cápsula possui o papel de impedir que a levedura sofra desidratação e evita a ingestão por amebas,

favorecendo a sua sobrevivência em ambientes hostis (Casadevall e Perfect, 1998; Idnurm *et al.*, 2005; McFadden *et al.*, 2006). Dentro do hospedeiro humano, esse papel protetor é verificado através da inibição da fagocitose por fagócitos através do aumento da cápsula; a inibição da migração de células do sistema imune para o sítio da infecção e a interferência na apresentação de antígenos por células do sistema imune de forma a reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias importantes para combater a infecção (Casadevall e Perfect, 1998; Idnurm *et al.*, 2005; McFadden *et al.*, 2006).



**Figura 1** - Representação esquemática da estrutura da parede celular e cápsula dos fungos. Modificado de Erwig e Gow, 2016.

No caso de *C. neoformans*, a cápsula é composta por dois grandes grupos de polissacarídeos e uma pequena porção de manoproteínas. O principal polissacarídeo que compõe essa estrutura é denominado glucuronoxilomanana (GXM) que representa 90% do total da cápsula, sendo o principal com propriedades imunogênicas e antigênicas. Apresenta-se em uma cadeia principal linear de  $\alpha$ -(1,3)-manana com resíduos de  $\beta$ -(1,2)-ácido glucurônico e massa variando entre 1700 a 7000 kDa. O segundo polissacarídeo é chamado galactoxilomanana (GalXM) que

representa cerca de 8% da composição da cápsula. A GalXM consiste em um esqueleto contendo  $\alpha$ -(1,6)-galactano e quatro ramificações curtas de oligossacarídeos com massa variável entre 100-1700 kDa. E, por fim, temos as manoproteínas compondo 2% da cápsula, porém o seu papel nessa estrutura ainda não está bem esclarecido. A síntese da cápsula ocorre no citoplasma sendo os componentes exportados por vesículas através da parede celular e podem apresentar diferenças conforme cada sorotipo (Janbon, 2004; McFadden *et al.*, 2006; Doering, 2009; Zaragoza *et al.*, 2009).

A parede celular dos fungos são compostos, em sua grande maioria, por quitina, beta-glucana e alfa-glucana. As beta-glucanas e a quitina, são os principais componentes alvos de pesquisa, uma vez, que apresentam alta capacidade imunorreguladora e estimulatória do SI do hospedeiro, além de promover resposta eficaz contra diversas infecções (Silva *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 2008; Nóbrega *et al.*, 2010).

## 2. *C. neoformans*

O fungo *C. neoformans* foi descrito pela primeira vez em 1894 pelo patologista Otto Busse e o cirurgião Abraham Buschke após o isolamento da infecção óssea de uma mulher (Busse, 1894; Barnett, 2010). Esse fungo pertencente ao filo basidiomiceto, apresentando-se de forma esférica com diâmetro de, aproximadamente, 2-8 $\mu$ m e presença de cápsula polissacarídica com espessura variando entre 5-30 $\mu$ m (Zaragoza *et al.*, 2003; Faganello *et al.*, 2006). O crescimento é leveduriforme com reprodução de forma assexuada, porém, com menor frequência, esse patógeno pode se reproduzir de forma sexuada através do controle do locus MAT (*mating type*) (Litvintseva *et al.*, 2003; Lin e Heitman, 2006).

Atualmente, *Cryptococcus* apresenta duas espécies (*neoformans* e *gattii*) e o *C. neoformans* apresenta duas variedades (var. *neoformans* e var. *grubii*), contemplando um total de cinco sorotipos conhecidos: A, B, C, D e AD (híbrido do sorotipo A com o sorotipo D). A variedade *neoformans* é formada pelo sorotipo D e a variedade *grubii* formado pelo sorotipo A. A espécie *C. gattii* não possui variedades, sendo composta apenas pelos sorotipos B e C. Todos esses sorotipos se diferem em aspectos filogenéticos, antigênicos, bioquímicos e ecológicos (Mitchell e Perfect, 1995; Lin e Heitman, 2006; Queiroz *et al.*, 2008; Ma e May, 2009; Silva *et al.*, 2012; Srikanta *et al.*, 2014;).

*C. gattii* pode ser encontrado em regiões de climas tropicais e subtropicais associados a diversas espécies de árvores, principalmente eucaliptos, sendo considerado endêmico nessas regiões pois está associado as causas de infecções criptocócicas em hospedeiros imunocompetentes correspondendo a taxas que variam de 70% a 80%, principalmente, na Austrália, Papua Nova Guiné e, recentemente, no surto que ocorreu na Ilha de Vancouver, no Canadá. Há relatos que *C. gattii* é responsável por pouco mais de 10% de criptococose em pacientes com Aids no sul da Califórnia e em Botswana e Malawi na África Subsaariana; entretanto, essa taxa reduzida de infecção em pacientes imunocomprometidos permanece inexplicável (Mitchell e Perfect, 1995; Lin e Heitman, 2006; Queiroz *et al.*, 2008; Ma e May, 2009; Srikanta *et al.*, 2014).

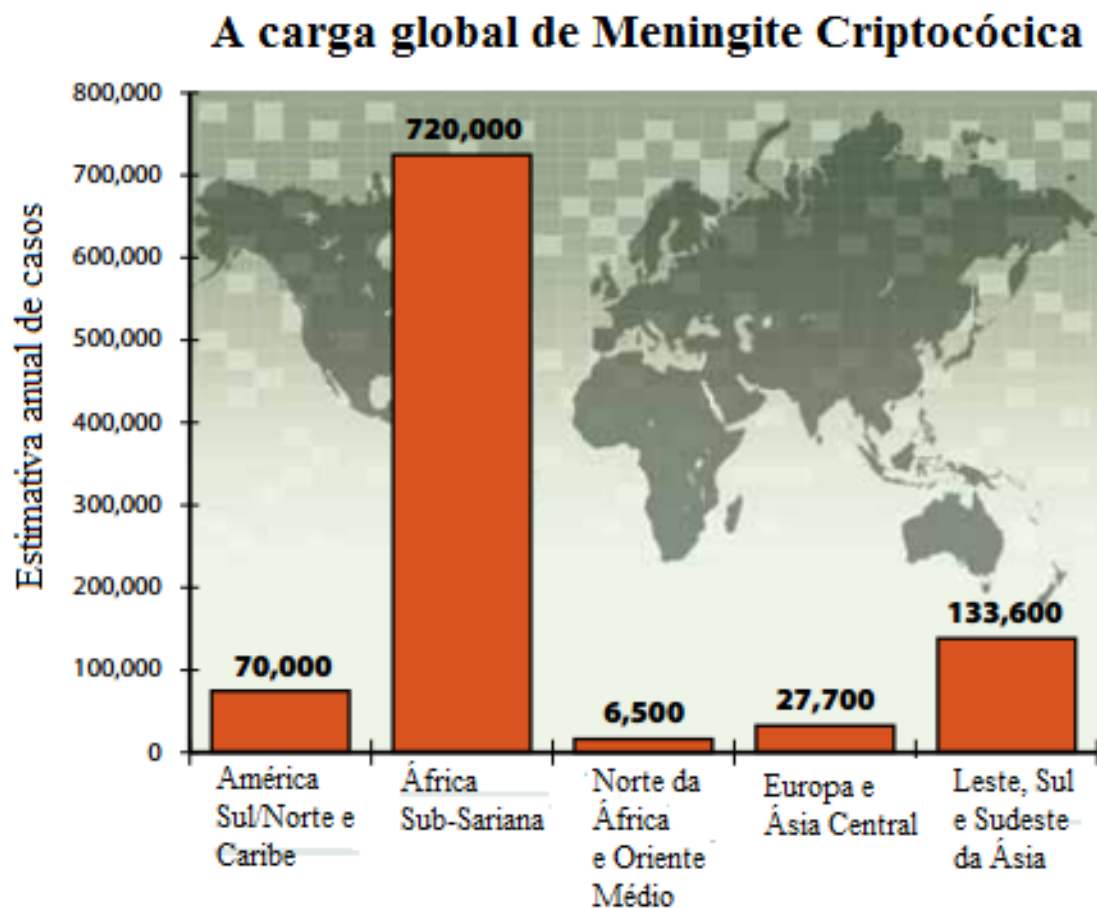
*C. neoformans* sorotipo A possui distribuição mundial enquanto que o sorotipo D é preferencialmente encontrado em regiões temperadas e ambos podem ser encontrados em excretas de aves e em matéria orgânica em decomposição. Esses dois sorotipos são os principais causadores das infecções fúngicas em hospedeiros imunocomprometidos, sendo que 95% do total correspondem ao sorotipo A, seguido pelo sorotipo D que compreende menos de 5% dos casos e os sorotipos B e C menor que 1%. Essa diferença pode ser explicada pela diferença geográfica e por maiores fatores de virulência apresentado pela variedade *grubii* em relação aos demais (Lin e Heitman, 2006; Lin, 2009; Srikanta *et al.*, 2014).

No Brasil, a prevalência dos sorotipos clínicos encontrados foi de 65% para o sorotipo A, 17,5% para o sorotipo B, 9% para o sorotipo D, 5% para o híbrido AD e 3% para o sorotipo C. Embora o nosso país apresente um padrão regional ecoepidemiológico distinto para a distribuição dessas variedades, nas regiões sudeste e sul há a predominância do sorotipo A enquanto que o sorotipo B é frequente na região nordeste (Pappalardo e Melhem, 2003; Lin e Heitman, 2006).

## 2.1 A Patologia – Criptococose

Somente na década de 80 o fungo *C. neoformans* começou a ter importância médica, pois os índices de criptococose (nome dado a infecção causada pelo *C. neoformans*) aumentaram significativamente em decorrência do aumento da quantidade de pacientes imunodeprimidos, principalmente, portadores do HIV, cânceres e transplantados. Estima-se que cerca de um milhão de indivíduos portadores do HIV desenvolvam meningite causada pelo *C. neoformans*, dos quais

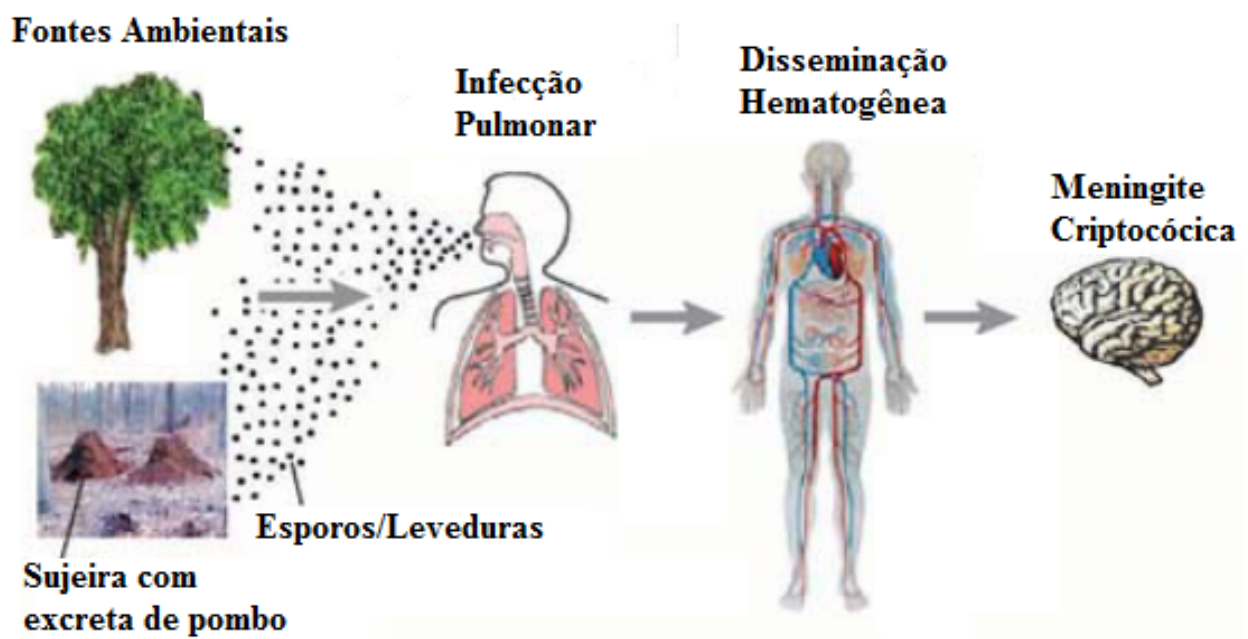
625 mil evoluem para óbito (Schop 2007; Park *et. al.*, 2009). A prevalência dos casos de criptococose em pacientes com HIV está diminuindo nos países desenvolvidos, isso se deve ao tratamento dos retrovirais associados aos antifúngicos. Todavia, a maioria dos casos de criptococose concentra-se na região subsariana na África seguida por demais regiões da Ásia (Figura 3). Em alguns países da África, a criptococose é considerada endêmica, atingindo índices próximos a 30% do total de pacientes com SIDA (revisado por Casadevall e Perfect, 1998). Além disso, esse patógeno possui a capacidade de infectar indivíduos imunocompetentes, porém a ocorrência desses casos é menos frequente (Mitchell e Perfect 1995).



**Figura 2** – Estimativa anual de casos de criptococose em pacientes infectados pelo HIV no mundo. Adaptado de [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

A infecção ocorre, inicialmente, após o hospedeiro inalar os propágulos do fungo presentes no ambiente contaminado. Esses propágulos podem ser

encontrados em excretas de aves e em matéria orgânica em decomposição. Ao entrar no trato respiratório do hospedeiro, o fungo pode colonizá-lo sem desencadear a patologia. Quando instaurado o processo patológico, esse apresenta-se, inicialmente, assintomático podendo ser eliminado ou ficar na forma latente. O quadro clínico comum da infecção é a meningoencefalite podendo acometer tanto os seres humanos quanto outros animais, embora a transmissão homem-animal ou animal-homem ainda não tenha sido descrito (Figura 4) (Chayakulkeeree e Perfect, 2006).



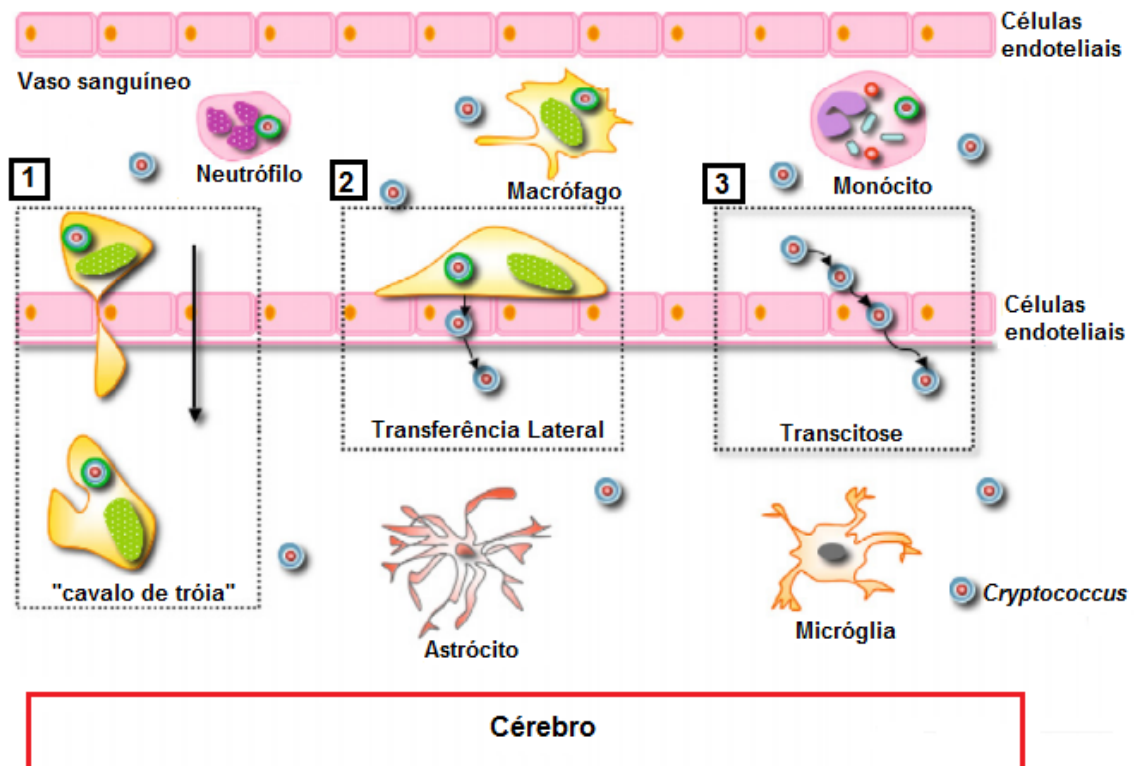
**Figura 3** – Ciclo de infecção do fungo *C. neoformans*. Adaptado de Lin & Heitman, 2006.

No momento em que o hospedeiro apresenta um comprometimento do sistema imune, o fungo é reativado e o processo infeccioso é iniciado. A interação primária do fungo com as células do sistema imune do hospedeiro ocorre nos pulmões, a qual envolve o reconhecimento dos componentes presentes na cápsula desse patógeno pelas células imunes residentes (Ma, *et al.*, 2006, Queiroz *et al.*, 2008; Srikanta *et al.*, 2014). Após o reconhecimento e adesão das leveduras pelas células fagocíticas, essas são internalizadas e induzem a formação e acidificação do fagolisossomo, como tentativa de eliminar o patógeno. Apesar da acidificação desse compartimento, o fungo é capaz de sobreviver e proliferar dentro das células



fagocíticas do hospedeiro, mecanismo esse que conferiu algumas vantagens ao fungo, dentre elas a capacidade de disseminação e proteção da RI. Alternativamente, as leveduras internalizadas podem evadir as células hospedeiras de duas formas distintas, ou por extrusão lítica que resulta em morte da célula hospedeira, ou por extrusão não lítica que deixa ambas as células intactas. *C. neoformans*, *C. grubbi* e *C. gatti* podem realizar a extrusão não lítica, sendo esse processo observado, principalmente, pela espécie *C. gatti*. Então, por esse motivo a morte fúngica é o melhor resultado para o hospedeiro (Alvarez e Casadeval, 2006; Ma, *et al.*, 2006; Srikanta *et al.*, 2014).

A disseminação do fungo pode ocorrer por via hematogênica ou linfática, podendo afetar diversos órgãos e tecidos, tais como as articulações, os olhos, a pele, os ossos, a próstata, os pulmões e o trato urinário, causando infecções localizadas. No entanto, é sabido que esse fungo possui tropismo pelo sistema nervoso central (SCN), sendo esse um ponto-chave na patogênese, apresentando o quadro clínico característico. Alguns estudiosos defendem a ideia que as leveduras internalizadas e livres sejam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica para chegar ao SNC por 3 maneiras distintas. A primeira é através do mecanismo denominado “cavalo de tróia”, na qual, fagócitos mononucleares transportam o micro-organismo em seu interior até o destino final onde estes são então liberados por exocitose lítica ou não lítica. O segundo mecanismo compreende a capacidade do fungo em infectar outras células a partir da célula hospedeira sem serem expostos ao meio extracelular, sendo esse processo denominado transferência lateral. Já o terceiro mecanismo é a transcitose endotelial que é um processo na qual as leveduras atravessam as células endoteliais dos vasos sanguíneos de forma direta (Figura 5) (Chen *et al.*, 2003; Lurberto *et al.*, 2003; Charlier *et al.*, 2005; Lin e Heitman, 2006; Queiroz *et al.*, 2008; Ma e May, 2009; Krondstad, *et al.*, 2011; Srikanta *et al.*, 2014).



**Figura 4** – Prováveis vias utilizados pelo fungo *Cryptococcus* para o cruzar a barreira hematoencefálica. 1 - Mecanismo “Cavalo-de-Tróia”; 2 - Transferência lateral; e 3 - Transcitose. Adaptado de Ma & May, 2009.

De forma peculiar, durante o processo de infecção o fungo apresenta alterações no tamanho e na estrutura da cápsula que ocorrem devido a alterações metabólicas induzidas pelo ambiente do hospedeiro como forma de escapar da ação do sistema imune. Um dos principais pontos observados é a formação de “células titã” que atingem tamanho de até 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro durante a infecção pulmonar primária. Isso propicia uma incapacidade do sistema imune em fagocitar esse patógeno favorecendo, assim, a disseminação; além disso, essas células gigantes são mais adaptadas e capazes de sobreviver em condições de estresse (Baker e Haugen, 1955; Zaragoza e Nielsen, 2013; Srikanta *et al.*, 2014).

### 3. Interação dos componentes da parede celular dos fungos com o sistema imune do hospedeiro

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra fungos são diversos e podem variar de mecanismos primitivos, porém não menos importante e bastante eficazes que vieram da evolução de organismos multicelulares, denominada imunidade inata a sofisticados mecanismos adaptativos, que são especificamente

induzidos durante a infecção e doença, denominados imunidade adaptativa. Citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1, IL-12 e IFN- $\gamma$ , são consideradas protetoras e eficazes contra as infecções fúngicas, enquanto que citocinas anti-inflamatórias do perfil Th2, como IL-10 e IL-4, induzem a depressão do sistema imune do hospedeiro levando a uma proliferação do patógeno e o avanço da patologia. Além disso, a colaboração de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, quimiocinas e demais receptores celulares contribuem para uma resposta efetiva contra a infecção (Brown 2011; Romani, 2011; Erwig e Gow, 2016).

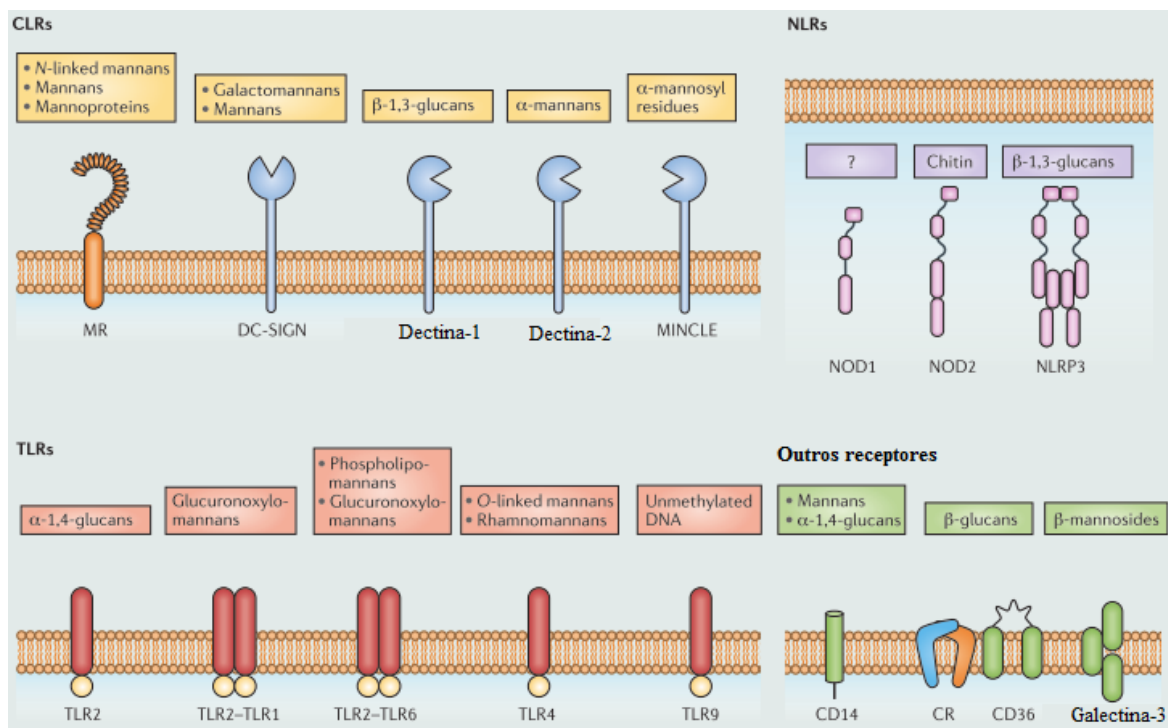
A primeira linha de defesa do hospedeiro é a imunidade inata, que estão presente em locais que fazem contato direto com os fungos, tais como as superfícies epiteliais, as superfícies de mucosas e dos tratos genito-urinário, gastrointestinal e respiratório. Essa linha de defesa não apresenta especificidade, no entanto é capaz de reconhecer o próprio do não próprio e ativar efetivamente o sistema adaptativo por meio de sinais específicos. Os mecanismos de defesa do hospedeiro são ativados após estruturas moleculares comuns e compartilhados por diversos patógenos (denominamos padrões moleculares associados a patógenos – PAMPs) serem reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células do hospedeiro. A finalidade do sistema imune inato é a destruição do patógeno por um processo denominado fagocitose, que é realizado por neutrófilos e leucócitos mononucleares (monócitos e macrófagos), e/ou através da secreção de quimiocinas, citocinas, indução da ativação co-estimulatória de células fagocíticas e apresentação de antígenos, realizado pelas células dendríticas (DCs), de forma a induzir uma resposta específica do sistema imune inato contra a infecção (Romani, 2011; Erwig e Gow, 2016). O reconhecimento das beta-glucanas dos fungos pelo sistema imune está presente e estabelecido desde os vertebrados primitivos. Nos mamíferos já foram descritos e definidos alguns receptores capazes de reconhecer esses polissacarídeos fúngicos, sendo: (1) receptores do tipo lectina C (CLRs); (2) receptores do tipo *Toll* (TLR) e (3) receptores do tipo NOD (NLR) – (Figura 2) (Levitz, 2010; Hardison e Brown, 2012).

Dentro da família do tipo lectina C existem três receptores importantes, o primeiro é a dectina-1 que é a mais estudada e bem esclarecida. Dectina-1 é um receptor transmembranar do tipo C sendo altamente expressa em células mielóides com especificidade para reconhecer  $\beta$ -1,3-glucana presente na parede celular dos fungos. O acoplamento da glucana ao receptor de dectina-1 desencadeia o processo

de fosforilação por diversas vias de sinalizações através de adaptadores distintos, como a quinase Syk, PLC $\gamma$ 2, CARD9 e Raf-1 (Reid *et al*, 2009) que resulta na secreção de citocinas e quimiocinas estimulatórias. Já o reconhecimento da manose ocorre através de dois receptores, o receptor CD206 e DC-SIGN (CD209), sendo considerados os principais receptores em células mielóides humanas. Esses dois receptores têm motivos citoplasmáticos que direcionam os antígenos monosilados para a via endocítica de células dendríticas para serem processados e subsequentemente apresentados as células-T. No entanto, a estimulação dos receptores de manose pode levar a respostas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, dependendo do tipo de patógeno e da célula hospedeira estudada. O terceiro receptor importante dentro da família lectina C é a dectina-2 que tem afinidade para a  $\alpha$ -mananas (Levitz, 2010; Brown, 2011; Hardison e Brown, 2012).

Os receptores do tipo *Toll* (TLRs) são receptores conservados que reconhecem os PAMPs e outros ligantes. Ao serem ativados induzem respostas comuns a esses receptores, incluindo ativação do inflamassoma, como também respostas específicas, independente ou não da ativação do sistema imune inato por células fagocíticas e DCs. A contribuição dos TLRs individuais para a resposta imune pode variar dependendo das espécies fúngicas, dos morfotipos fúngicos e da via de infecção. A GXM (principal componente da cápsula de *C. neoformans*) é reconhecido por TLR4 e CD14, porém essa ativação é depende da via de transdução de sinal do TLR e ocorre parcialmente, sendo, portanto, responsável por imunossupressão do sistema imune do hospedeiro (Levitz *et al.*, 2010; Brown, 2011; Hardison e Brown, 2012).

Os receptores NLR são citoplasmáticos e reconhecem uma ampla variedade de substâncias como ATP e ácido úrico (marcadores de necrose celular); distúrbios iônicos (liberação de K<sup>+</sup>) e alguns componentes microbianos ( $\beta$ -1,3-glucana). Após a ativação desses receptores, ocorre uma cascata de reações que levam a ativação do complexo multiprotéico denominado inflamassoma, que tem por finalidade ativar a caspase-1 e assim promover a maturação e liberação das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18. Ambas promovem a maturação e atração de outras células do sistema imune como tentativa para conter e eliminar a infecção. Ainda não se sabe como os receptores NLR são capazes de diferenciar os variados e distintos estímulos, mas é sabido que esses apresentam participação em doenças autoimunes, como gota, diabetes tipo 2 e arterosclerose (Robbins & Cotran, 2016).



**Figura 5** - Representação esquemática dos receptores de reconhecimento padrão (PRR) das células do sistema imune. Modificado de Erwig e Gow, 2016.

Mesmo diante desses diversos mecanismos de reconhecimento e proteção do sistema imune contra os fungos, esses ainda são capazes de evadir das defesas do hospedeiro. Isso se deve, principalmente, aos fatores de virulência, anteriormente descritos, que protegem esses patógenos contra a resposta imune do hospedeiro. Em pacientes imunodeprimidos, a situação é mais crítica, pois a quantidade de células imunitárias do hospedeiro, principalmente os fagócitos, encontra-se diminuídos, dificultando assim a contenção e efetiva eliminação da infecção (Kurokawa *et al.*, 1998).

O fungo *C. neoformans*, durante a infecção em pacientes imunocomprometidos, por meio da cápsula polissacarídica, promove uma ativação robusta da via alternativa do complemento de forma a esgotar os mecanismos desse sistema e tornar o hospedeiro mais susceptível a infecção. Outro efeito imunossupressor induzido pela cápsula é a regulação negativa na secreção de citocinas estimuladoras, tais como interleucina-1 e TNF- $\alpha$ , e regulação positiva de citocinas anti-inflamatórias (IL-6 e IL-10) por monócitos humanos, além de inibir a linfoproliferação e induzir clones de células imune do perfil tipo Th2. Com a supressão do hospedeiro é observado um aumento da carga fúngica e os anticorpos

contra os componentes da cápsula não parecem contribuir para a fagocitose da levedura como forma de conter a infecção (Kurokawa *et al.*, 1998; Levitz, 2010).

Entretanto, as glucanas, especialmente a  $\beta$ -(1,3)-glucana, presentes na parede celular dos fungos possui capacidade imunomodulatória benéfica ao hospedeiro contra infecções. Os carboidratos presentes na parede celular dos fungos podem ser separado em frações, sendo a fração 1 (F1) composta predominantemente por  $\beta$ -(1,3)-glucana. Estudos realizados estimulando o sistema imune com as frações derivadas da parede celular de fungos como *H. capsulatum*, *C. neoformans* e *Fonsecae pedrosoi*, demonstram a capacidade dessas frações em reproduzir um ambiente propício para a eliminação da infecção através do recrutamento e ativação celular, indução de citocinas pró-inflamatórias, redução da carga fúngica e aumento da sobrevida dos animais (Silva *et al.*, 1985; Sá-Nunes *et al.*, 2004; Rappleye e Goldman, 2006; Nóbrega *et al.*, 2010)

Em uma revisão, Cassone e Casadevall (2012) demonstram que diversos grupos têm trabalhado para desenvolver novas estratégias terapêuticas contras as infecções fúngicas. Porém, alguns desses tratamentos terapêuticos que incluem micro-organismos atenuados não apresentaram uma resposta efetora efetiva e não possui a mesma segurança que as atuais vacinas de referência utilizadas no mercado. Dessa forma, as frações podem ser o primeiro passo para o desenvolvimento de medidas terapêuticas contra infecções fúngicas.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo geral

Considerando a persistência do *C. neoformans* no interior dos macrófagos e a incapacidade dessas células em eliminar adequadamente o fungo, o objetivo deste trabalho foi identificar se os componentes da parede celular de *C. neoformans*, presentes na fração F1, são capazes de modular a ativação de macrófagos durante a infecção experimental com *C. neoformans in vitro* e *in vivo*.

Para atingir tal objetivo, foram desenvolvidas diferentes metas experimentais:

#### Metas:

- 1 - Isolar a fração F1 da parede celular das linhagens capsular e acapsular, dos sorotipos A e D (H99, B3501 e *cap67Δ*) do fungo *C. neoformans*;
- 2 - Identificar as frações que induzem a ativação de macrófagos e ao aumento da atividade microbicida;
- 3- Testar as frações escolhidas na meta anterior, na produção de citocinas importantes para a resposta imune inata;
- 4- Testara(s) frações em modelo experimental de infecção *in vivo*;

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Animais

Os animais utilizados durante a execução desse trabalho foram camundongos da linhagem isogênica C57BL/6 com idade entre 8-12 semanas, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Biologia – IB da Universidade de Brasília, sob padrões sanitários previamente estabelecidos, fornecimento de água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Brasília (UnBdoc nº. 66729/2016).

#### 2. Cultura Celular

Os macrófagos utilizados neste trabalho foram obtidos de 2 fontes distintas, sendo elas, macrófagos derivados de medula óssea (BMDC) e macrófagos recrutados do peritônio.

Os macrófagos foram obtidos da medula pela lavagem do fêmur e tíbia dos camundongos, de acordo com protocolos previamente estabelecidos na literatura (Lutz *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2008; Marim, 2010). Resumidamente, os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), seguido pela extirpação do fêmur e da tíbia das patas traseiras. As epífises do fêmur e da tíbia foram retiradas e descartadas e, posteriormente realizada lavagem do interior destes utilizando uma seringa de 1mL contendo meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) não suplementado, para a obtenção das células progenitoras. Em seguida, essas células foram centrifugadas a 300xg à 4°C durante 5 minutos, e ao final foram contadas. Imediatamente, elas foram ressuspensas em meio de diferenciação de macrófagos, contendo 20% de Soro Fetal Bovino Inativado (SFBi) + 80% RPMI-1640 + 1µL de GM-CSF/mL + 1µL de β-mercapto/mL. Essas células foram, então, distribuídas em placas de Petri, na concentração de 4x10<sup>6</sup>, contendo 10 mL de meio de diferenciação e colocado em estufa à 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. No 4º dia, após início da diferenciação, foram adicionados à cultura mais 10 mL de meio de



diferenciação. No 8º dia, descartou-se as células dendríticas e os macrófagos foram contados e semeados, em placas específicas para realização dos experimentos, com meio de experimentação contendo 10% SBFi e 90% RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), e, depois, deixadas em repouso por um tempo de 24 horas. Após esse prazo de repouso, o meio da cultura foi renovado e iniciados os experimentos.

Para a obtenção dos macrófagos derivados do peritônio, foram injetados 2 mL de tioglicolato caldo (Laborclin) na cavidade intraperitoneal dos camundongos. Após 4 dias, os animais foram sacrificados e realizado o lavado peritoneal com 10 mL de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) gelado não suplementado na cavidade peritoneal do camundongo. As células aspiradas foram lavadas com RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) não suplementado e centrifugadas a 300xg, 4°C durante por 5 minutos (Zhang, *et al.*, 2008). Após a lavagem, elas foram contadas e semeadas em placas de cultura com meio experimental composto de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) + 10% de SBFi. Após a distribuição das células nas placas de cultivo, essas foram deixadas em repouso por um período de 24 horas e, ao término desse prazo, o meio foi renovado e seguiu-se com os experimentos.

### **3. *C. neoformans***

Nesse trabalho foram utilizados as três linhagens mais estudadas do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans*: a linhagem H99 (*C. neoformans* var. *grubii* sorotipo A) considerada a mais virulenta, a linhagem B3501 (*C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D) representante da variedade do grupo D e a linhagem mutante hipovirulenta e acapsular *cap67Δ* (*C. neoformans* var. *neoformans* sorotipo D - mutante derivado da linhagem B3501) (Mitchell e Perfect, 1995; Lin e Heitman, 2006; Ma e May, 2009; Srikanta *et al.*, 2014;). Estas linhagens foram semeadas em placas de petri contendo meio sólido Sabouraud Dextrose (Acumedia) e crescidas em estufa a 30°C por 5 dias. Após esse período, as placas contendo as colônias foram armazenadas na geladeira, como estoque, sendo renovadas a cada 30 dias. Para indução da proliferação e expansão das leveduras, estas foram coletadas e inoculadas em meio caldo Sabouraud Dextrose (Sigma-Aldrich) por 72 horas, a 30°C sob agitação de 120 RPM. Após o crescimento em meio líquido, o fungo foi coletado, centrifugado à 2000xg por 5 minutos, e lavados 2 vezes com solução tampão fosfato (PBS).

#### **4. Obtenção da Fração F1 da parede celular das linhagens H99, B3501 e *cap67Δ* do fungo *Cryptococcus neoformans***

Após a lavagem descrita acima, os sobrenadantes de cada linhagem do fungo foram descartados, e ao final o *pellet* foi pesado e submetido ao tratamento com Formaldeído a 10% por um período de 24 horas em temperatura ambiente e sob agitação. Em seguida, a solução contendo massa fúngica foi centrifugado a 2000xg por 5 minutos e lavado 3 vezes com água destilada estéril. Em seguida, o precipitado foi macerado com nitrogênio líquido e ressuspenso em água destilada estéril e centrifugado por 5 vezes a 2000xg para a retirada de resíduos celulares. Ao final dessa etapa o fungo foi semeado em placa de Petri contendo meio sólido Sabouraud Dextrose (Acumedia) para verificação da viabilidade celular.

O próximo passo foi a extração lipídica: foi adicionado ao fungo uma solução de Clorofórmio e Metanol (proporção 2:1) sob agitação magnética, a temperatura ambiente por 4 horas. Posteriormente, o material foi lavado 3 vezes com PBS, centrifugado a 4000xg durante 5 minutos. Esse tratamento foi repetido mais 1 vez. Após os tratamentos de extração lipídica e lavagem, o *pellet* foi seco em estufa à 37 °C por até 3 dias. A parede celular bruta, obtida da massa do fungo, foi novamente pesada e ressuspensa em NaOH 1N (para cada 10 mg da massa do fungo foi usado 1mL de NaOH 1N) à temperatura ambiente por 2 horas e, depois, centrifugada a 4500xg à temperatura ambiente por 10 minutos. O precipitado foi submetido ao processo anterior por mais 3 vezes. Ao término da última centrifugação, o precipitado alcali-insolúvel é lavado com água destilada estéril até o momento que o pH se aproximar de 7,0.

Em seguida, o *pellet* é liofilizado e o pó resultante é denominado fração F1. Essa fração é constituída, principalmente, de  $\beta$ -1-3-glucana (Sá-Nunes *et al*, 2004, Nóbrega *et al.*, 2010). Foi preparada, a partir da fração F1, uma solução com PBS 1x em concentrações variadas, tais como, 25 $\mu$ g/mL, 37,5 $\mu$ g/mL, 50 $\mu$ g/mL, 75 $\mu$ g/mL e 100 $\mu$ g/mL para realização dos ensaios.

#### **5. Ativação dos macrófagos estimulados com as Frações F1**

Para os ensaios *in vitro*, os BMDC ou macrófagos peritoniais foram estimulados com a fração F1 obtidas das 3 linhagens do *C. neoformans* (H99, B3501

e *cap67Δ*) e Zymozan, como controle, todos em diferentes concentrações de estímulo (25µg/mL, 37,5µg/mL, 50µg/mL, 75µg/mL e 100µg/mL) por um período de tempo de 18 horas.

Para a indução da citocina IL-1β, os macrófagos foram estimulados previamente com as frações F1 por 17 horas e 15 minutos. Nos 45 minutos anteriores ao término do tempo de 18 horas, foi adicionado ATP (5 Mm - Invivogen) ou Nigericina (20µM - Invivogen). Como controle positivo foi utilizado LPS (não ultrapuro, Invivogen) na concentração de 500ng/mL e ATP (5 Mm - Invivogen) ou Nigericina (20µM – Invivogen) nos tempos descritos anteriormente. Por fim, o sobrenadante foi coletado e armazenado no – 80 °C para posterior dosagem de citocinas inflamatórias, tais como, TNF-α.

## **6. Dosagem de Citocinas**

Citocinas presentes no sobrenadante dos ensaios foram analisadas pelo método ELISA, utilizando-se kits comerciais (eBioscience ou BD). O procedimento foi realizado conforme instruções do fabricante. Os dados gerados foram processados pelo software *SoftMax Pro* 5.4. (Molecular Devices) e os níveis das citocinas foram demonstrados em seus valores absolutos (pg/mL).

## **7. Dosagem Óxido Nítrico (NO)**

O óxido nítrico (NO) é um gás que se decompõe em nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitratos (NO<sub>3</sub>), e o nitrito formado no sobrenadante da cultura das células foi determinado pela reação colorimétrica de *Griess* e avaliado através de leitura por espectrofotômetro (520-550 nm). Os valores foram obtidos baseando-se na curva padrão, cujos valores foram de 1.56, 3.12, 6.24, 12.48, 24.96, 49.92 e 99.84 micromolar (µM) (Green, *et al.*, 1981).

## **8. Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo**

O ensaio de viabilidade celular foi feito usando a técnica de citometria de fluxo. As células, na concentração de 1x10<sup>6</sup>, foram incubadas à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e estimuladas nas concentrações de 25µg/mL, 37,5µg/mL, 50µg/mL, 75µg/mL e

100µg/mL. Após a incubação, as células foram desaderidas usando a solução TrypLE (Invitrogen), lavadas com PBS 1x, centrifugadas a 300xg por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS 1x + 2% SFBi e marcadas com PI (10 microgramas por mililitro - µg/mL) durante 5 minutos. O controle positivo para PI foi o etanol 70%. Os dados gerados foram processados pelos softwares *Flow Joy 8.7* e *SoftMax Pro 5.4*.

## 9. Ensaio de Fagocitose e Atividade Microbica

Para avaliar a ativação de macrófagos peritoniais pelas frações resultando no aumento da internalização e da ação microbica, os macrófagos foram plaqueados na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço (ensaio de fagocitose) e na concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço (ensaio de atividade microbica). O tratamento das células foi feito utilizando as frações derivadas das 3 linhagens do fungo, nas concentrações de 37,5µg/mL e 50µg/mL por um tempo de 1 hora e 30 minutos.

Logo após o estímulo, as células foram lavadas com RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) não suplementado e os macrófagos foram infectados com a linhagem H99 do fungo em MOI de 5:1 (5 fungos para cada macrófago), em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% SFBi. As leveduras foram opsonizadas previamente com o anticorpo 18B7 (2 µg/mL) por 45 minutos a 37°C. Os macrófagos foram infectados por 6 horas, ou por 12 horas. Decorridas 3 horas à infecção, todas as culturas foram lavadas com RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) para remoção das leveduras não internalizadas ou em suspensão.

Ao final dos tempos preestabelecidos para a infecção, as culturas para análise de fagocitose tiveram os sobrenadantes descartados e as células foram marcadas utilizando o kit Instant Prov (Newprov®) - conforme orientações do fabricante -, e depois a quantidade de fungo internalizado foi determinada de um total de 100 macrófagos, analisados em campos aleatórios da placa. Nas culturas para avaliar a atividade microbica, os sobrenadantes foram descartados e, em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e posteriormente lisadas com 50 µL de uma solução aquosa de dodecil sulfato de sódio (SDS – Bio-Rad) na concentração de 0,05%, por até 5 minutos. O lisado foi coletado e 10 µL foram utilizados para a diluição seriada até 1/1000 de PBS. A seguir 100 µL da diluição de 1/1000 foram plaqueados em placas de petri com meio Sabouraud Ágar (Acumedia),

e incubadas a 30°C por 72 horas. Após este período, as colônias foram contadas (CFU) e a capacidade microbicida dos macrófagos foi determinada.

## 10. Curva de Sobrevivência

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram usados como modelo de infecção neste estudo para avaliar a capacidade protetora induzida pela fração F1 do fungo B3501. Foram separados 3 grupos, contendo 4 animais por grupo, e cada grupo recebeu determinados estímulos antes da infecção. Os estímulos foram realizados por via intranasal com PBS para o grupo controle negativo, com Zymozan na concentração de 37,5 µg/mL para o grupo controle positivo e com a fração F1 na concentração de 37,5 µg/mL para o grupo experimental, todos no tempo de 24 horas que antecedeu a infecção. Após o período de 24 h do estímulo, todos os animais foram submetidos a infecção com células da linhagem H99 do fungo *C. neoformans* na concentração de  $1 \times 10^5$  por via intratraqueal.

Os animais foram acompanhados diariamente, por um período total de 40 dias, e a sobrevivência foi posteriormente analisada.

## 11. Quantificação de Citocinas do macerado do pulmão

Para esse ensaio foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 6-8 semanas, separados em 3 grupos, contendo 3 animais por grupo. Os animais foram induzidos ao mesmo procedimento de estímulo e infecção conforme descrito anteriormente. Seguindo os mesmos procedimentos de tratamento e infecção.

No tempo de 15 dias após a infecção os animais foram sacrificados, seguindo as normas éticas estabelecidas, e os pulmões foram extirpados, macerados em 1 mL de PBS, centrifugados e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C, conforme protocolo preconizado no laboratório, até o momento da dosagem.

A quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  presentes no macerado foi realizado pelo método imunoenzimático (ELISA) conforme os procedimentos estabelecidos pelo fabricante. O nível absoluto das citocinas presentes no macerado foi calculado baseado na curva padrão fornecida pelo fabricante.

## 12. Análise estatística

Os resultados apresentados neste trabalho tratam-se de ensaios representativos, com grupos em triplicatas, de, pelo menos, dois ensaios independentes. Foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software) para as análises estatísticas. Dados considerados significativos foram demonstrados com \*\*\*\*, quando  $P < 0,0001$ ; com \*\*\*, quando  $P < 0,001$ ; com \*\*, quando  $P < 0,01$ ; com \*, quando  $P < 0,05$  e ns, quando  $P > 0,05$ .

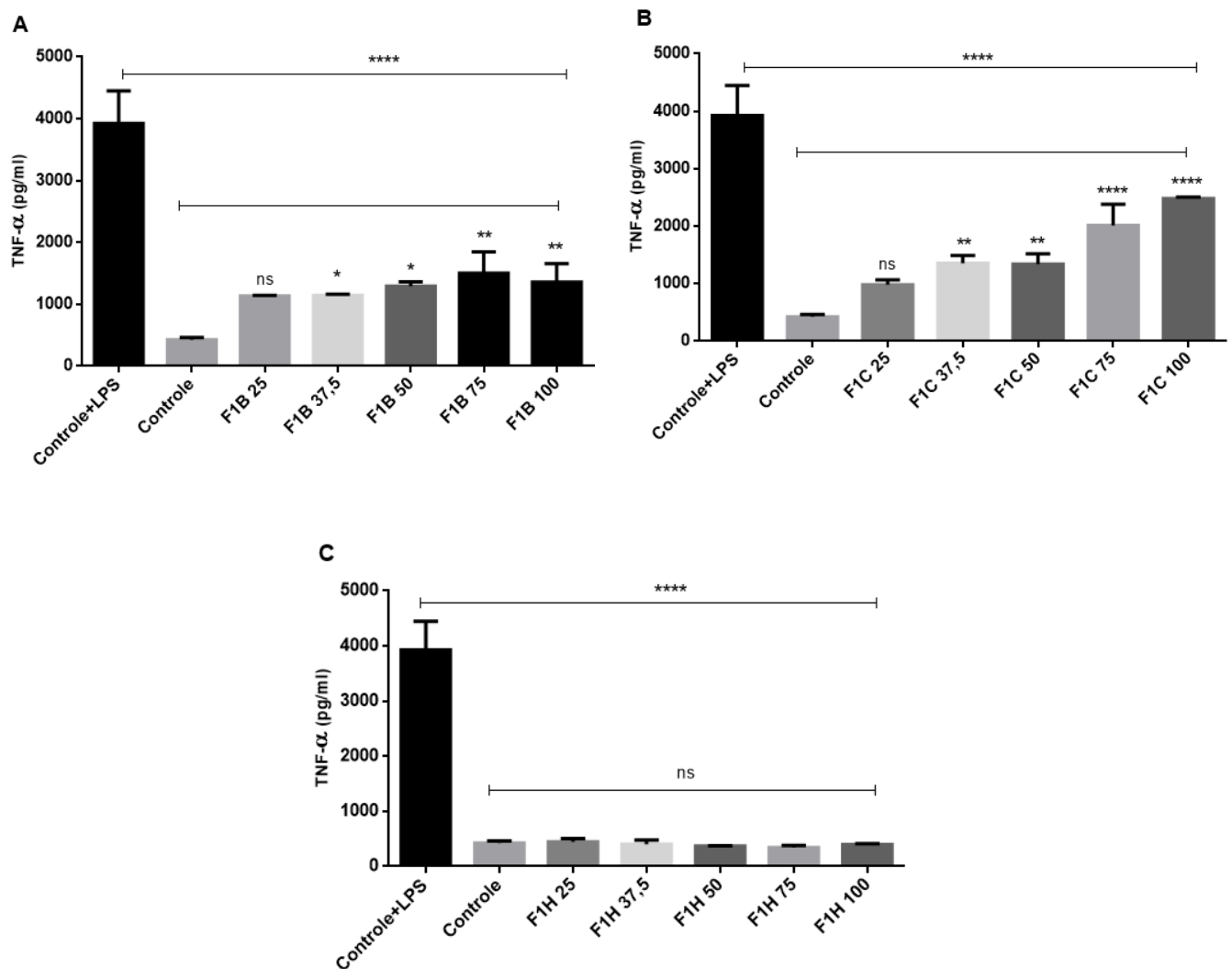
## IV. RESULTADOS

### 1. Frações F1 da parede celular de *Cryptococcus neoformans* induzem a ativação dos macrófagos murinos.

A secreção e produção de TNF- $\alpha$  está relacionada, dentre outras funções, com a ativação e proliferação de algumas células, tais como os macrófagos, frente a determinados estímulos. Desta forma, analisou-se a capacidade das frações F1 de *C. neoformans* em induzir a secreção de TNF- $\alpha$  *in vitro* em macrófagos peritoneais estimulados com as frações extraídas das 3 linhagens do fungo *C. neoformans* em diferentes concentrações por um período de 18 horas.

As frações F1 da linhagem B3501 (F1B) e da linhagem mutante *cap67* $\Delta$  (F1C), a partir da concentração de 37  $\mu\text{g/mL}$ , foram capazes de induzir a secreção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos (figura 6A e 6B). Contrariamente, a fração F1 da linhagem H99 (F1H) não induziu a secreção da citocina em nenhuma das concentrações analisadas.

Esses dados sugerem que as frações F1 das linhagens B3501 e F1 da linhagem *cap67* $\Delta$  são capazes de ativar os macrófagos e induzir um ambiente pró-inflamatório propício para a contenção e/ou eliminação da infecção.



**Figura 6 – Produção de TNF- $\alpha$  induzida por estímulos de diferentes concentrações das Frações F1 em macrófagos peritoneais.** Secreção de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneais na presença de LPS e da fração F1 da linhagem B3501 (A), F1 da linhagem *cap67Δ* (B) e F1 da linhagem H99 (C) de *C. neoformans* nas concentrações de 25 µg/mL, 37,5 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL e 100 µg/mL por um período de 18 horas de estímulos. Diferença significativa ANOVA  $p < 0,05$ .

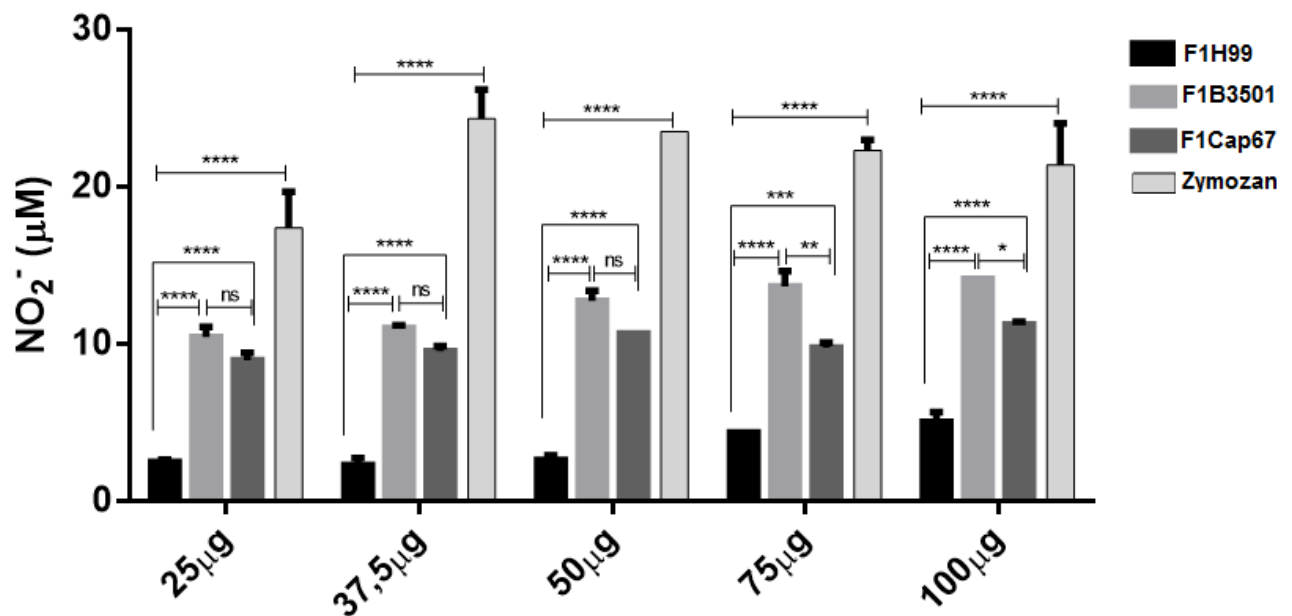
## 2. As frações F1 da parede celular do fungo são capazes de induzir a produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos murinos

Considerando-se que as frações F1B e F1C foram capazes de ativar e induzir a secreção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos peritoneais, verificou-se se essa ativação estava também relacionada a ação fungicida através da produção de óxido nítrico



(NO). A produção de NO é um dos mecanismos efetores utilizados por macrófagos e outros tipos celulares no combate as infecções fúngicas, incluindo danos e morte contra o fungo *C. neoformans*.

Conforme demonstrado na figura 2, pode-se verificar que as mesmas frações que induziram a produção de TNF- $\alpha$  também foram capazes de induzir a produção de NO pelas células previamente estimuladas, corroborando, assim com os resultados apresentados na Figura 6. Esses resultados inferem a provável ação dessas frações em modular essas células do sistema imune. A fração F1H99 somente produziu NO em concentrações mais elevadas, apesar de não induzir a secreção do TNF- $\alpha$ .



**Figura 7 – Produção de Óxido Nítrico (NO) em resposta a estímulos de diferentes concentrações das Frações F1 em macrófagos peritoneais.** Níveis de óxido nítrico no sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais na presença das frações F1 da linhagem H99, da linhagem B3501 e linhagem mutante acapsular *cap67Δ* de *C. neoformans* nas concentrações de 25 µg/mL, 37,5 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL e 100 µg/mL após 18 horas de estímulo.

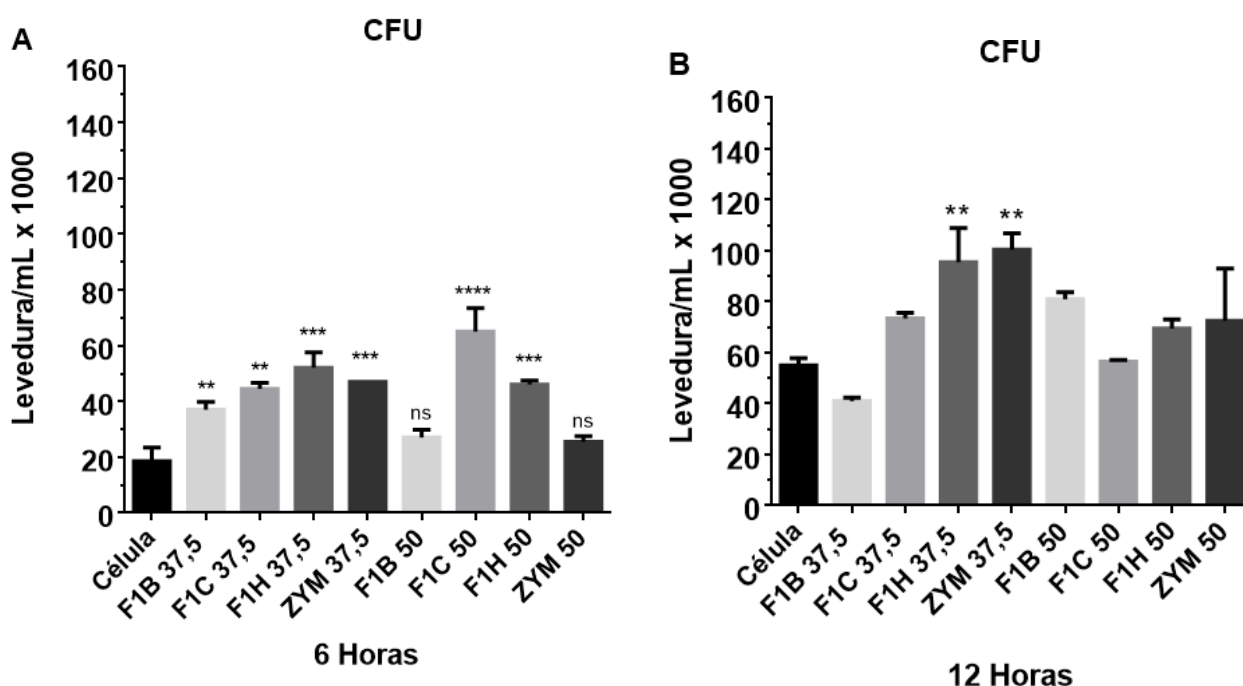
### 3. Aumento da capacidade fungicida dos macrófagos induzida pelas frações

Após verificar a efetiva ativação dos macrófagos frente ao estímulo com as frações, o passo seguinte foi realizar a infecção das células previamente

estimuladas com o fungo *C. neoformans* e avaliar a sua capacidade fungicida nos tempos de 6h e 12h (Figura 8 A-B).

No tempo inicial de 6h, com exceção da fração F1B e de Zym na concentração de 50 µg/mL, não foi possível observar ação fungicida dos macrófagos contra a infecção. Entretanto essa situação se inverte no tempo de 12h, na qual se verifica uma recuperação menor das leveduras em todos os macrófagos previamente estimulados, com exceção dos tratados com a fração F1H e Zym na concentração de 37,5 µg/mL.

Esses dados corroboram com os demais anteriormente apresentados (Figura 6 e Figura 7), reafirmando a fração F1B na concentração de 37,5 µg/mL como a que melhor induz e modula a resposta imune.

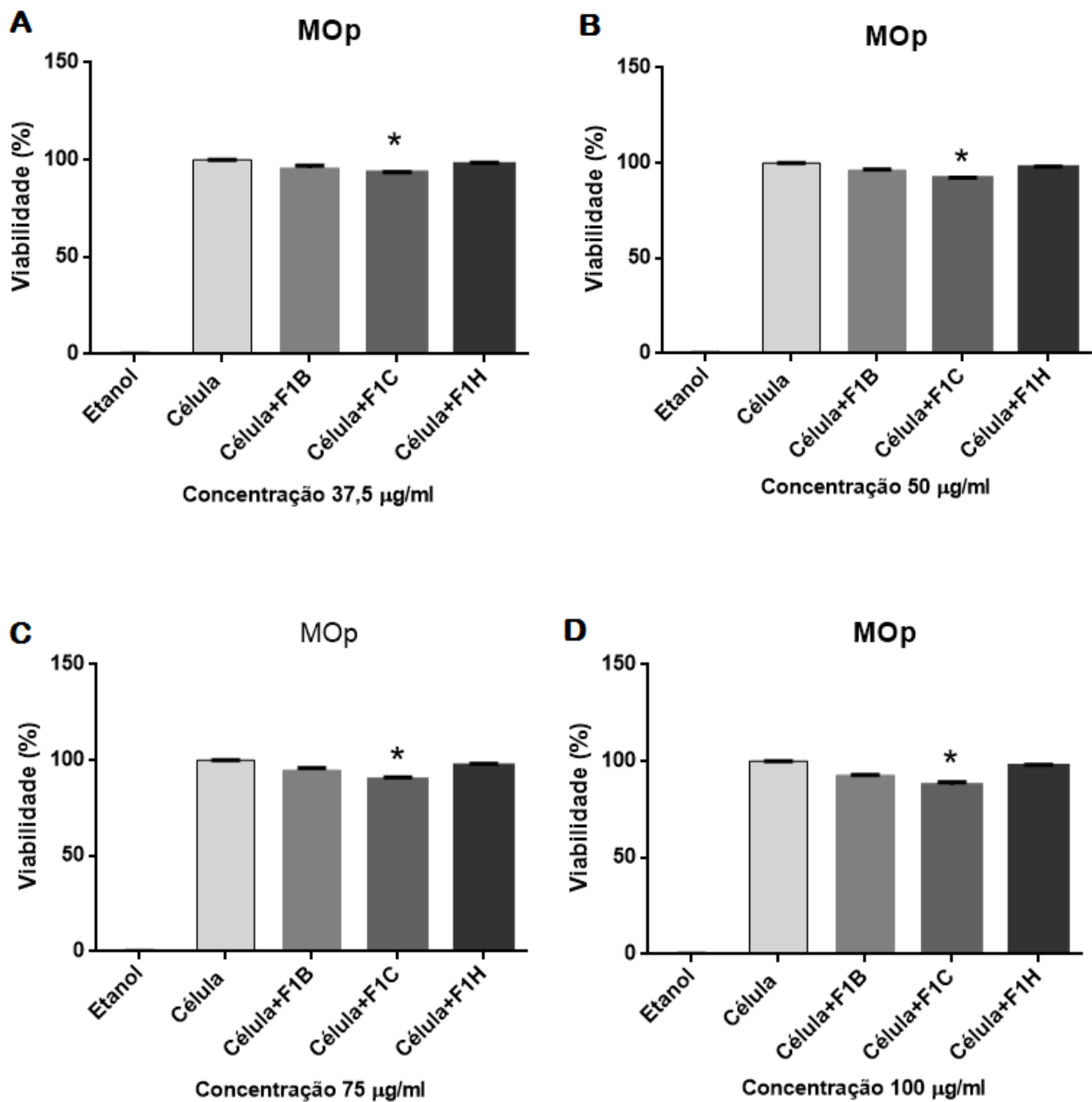


**Figura 8 – Índice de fagocitose por macrófagos das leveduras da linhagem H99 de *C. neoformans* após estímulos com as frações.** Os macrófagos peritoneais foram previamente estimuladas, por um período de 1 e ½ hora, com as frações da linhagem B3501 (F1B), da linhagem *cap67Δ* (F1C) e da linhagem H99 (F1H) nas concentrações de 37,5 µg/mL e 50 µg/mL. Após o período de estímulo as células foram infectadas com as leveduras da linhagem H99 (MOI 5:1) opsonizadas previamente com o anticorpo 18B7 (3 µL/1 x 10<sup>7</sup> levedura). Nos tempos de 6 horas e 12 horas as células foram lavadas, lisadas com SDS 0,05% e diluições desse lisado foram semeados em meio Sabouraud ágar (Acumedia) por até 4 dias a 30°C. Os gráficos representam as unidades formadoras de colônias (CFU).

#### **4. As frações F1B e F1H não alteram a viabilidade celular**

Considerando que algumas frações não foram capazes de aumentar a atividade microbicida dos macrófagos, bem como do TNF- $\alpha$  e em algumas concentrações a produção de NO, analisamos se as frações poderiam estar interferindo com a viabilidade das células. Desta forma, a viabilidade celular dos macrófagos peritoniais que foram previamente estimuladas com as frações foi analisada por citometria de fluxo (Figura 9 A-D). A fração F1B não alterou a viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 9 A-D). A fração F1H (Figura 9 A-D) não alterou a viabilidade, da mesma forma que não foi capaz de ativar as células por indução de citocina (Figura 6C) e nem induzir a produção de NO (Figura 7), subentendendo, assim, a sua incapacidade em modular a ativação dos macrófagos.

No entanto, a viabilidade celular foi diminuída significativamente nos estímulos decorridos da fração F1C (Figura 9 A-D) em todas as concentrações.



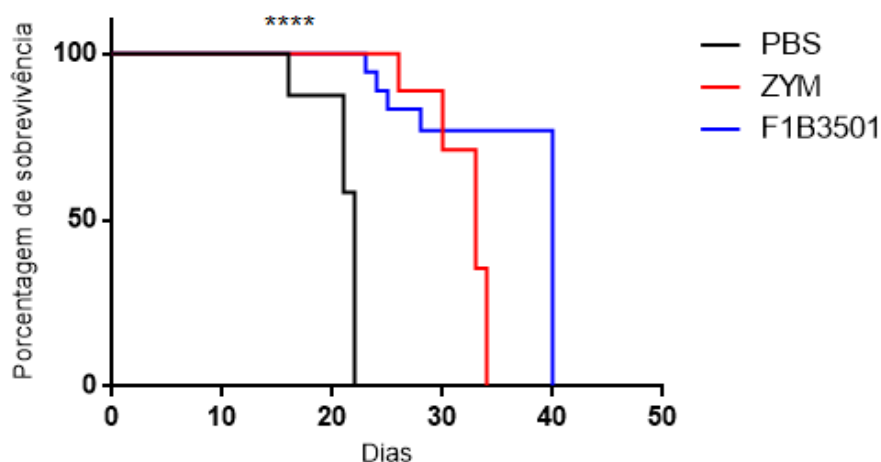
**Figura 9 – Viabilidade celular de macrófagos peritoneais após estímulos com as frações F1 das linhagens de *C. neoformans*.** Os macrófagos foram estimulados previamente com as frações das linhagens B3501 (F1B), da linhagem *cap67Δ* (F1C) da linhagem H99 (F1H) de *C. neoformans* nas concentrações de 37,5 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL e 100 µg/mL por um período de 18 horas de estímulo.

## 5. A fração F1B é capaz de aumentar a sobrevivência dos animais infectados por *C. neoformans*.

Visto que, nos experimentos *in vitro*, a fração F1B foi a que apresentou altos níveis de TNF- $\alpha$ , NO e alta capacidade microbicida, além de não induziu a morte das células, esta fração foi escolhida para os ensaios *in vivo*.

Os animais do grupo controle que, receberam como estímulo apenas a solução tampão antes da infecção com o isolado virulento H99 do fungo *C. neoformans*, começaram a morrer por volta da 2ª semana após a infecção, sucumbindo totalmente na 3ª semana. Já os animais do grupo Zym sobreviveram até o 34º dia, apresentando assim, uma sobrevivência intermediária entre os três grupos. Contudo, o grupo que recebeu o estímulo com a fração F1B apresentou melhor sobrevivência dentre os grupos, exibindo uma taxa de sobrevivência 2 vezes maior que o grupo controle (Figura 10).

Dessa forma, é possível perceber que o estímulo prévio realizado com a fração F1B pôde conferir aos animais uma melhor resposta contra a infecção, de forma tal, a modular a resposta imune, conferindo então, uma maior sobrevivência que os demais grupos.

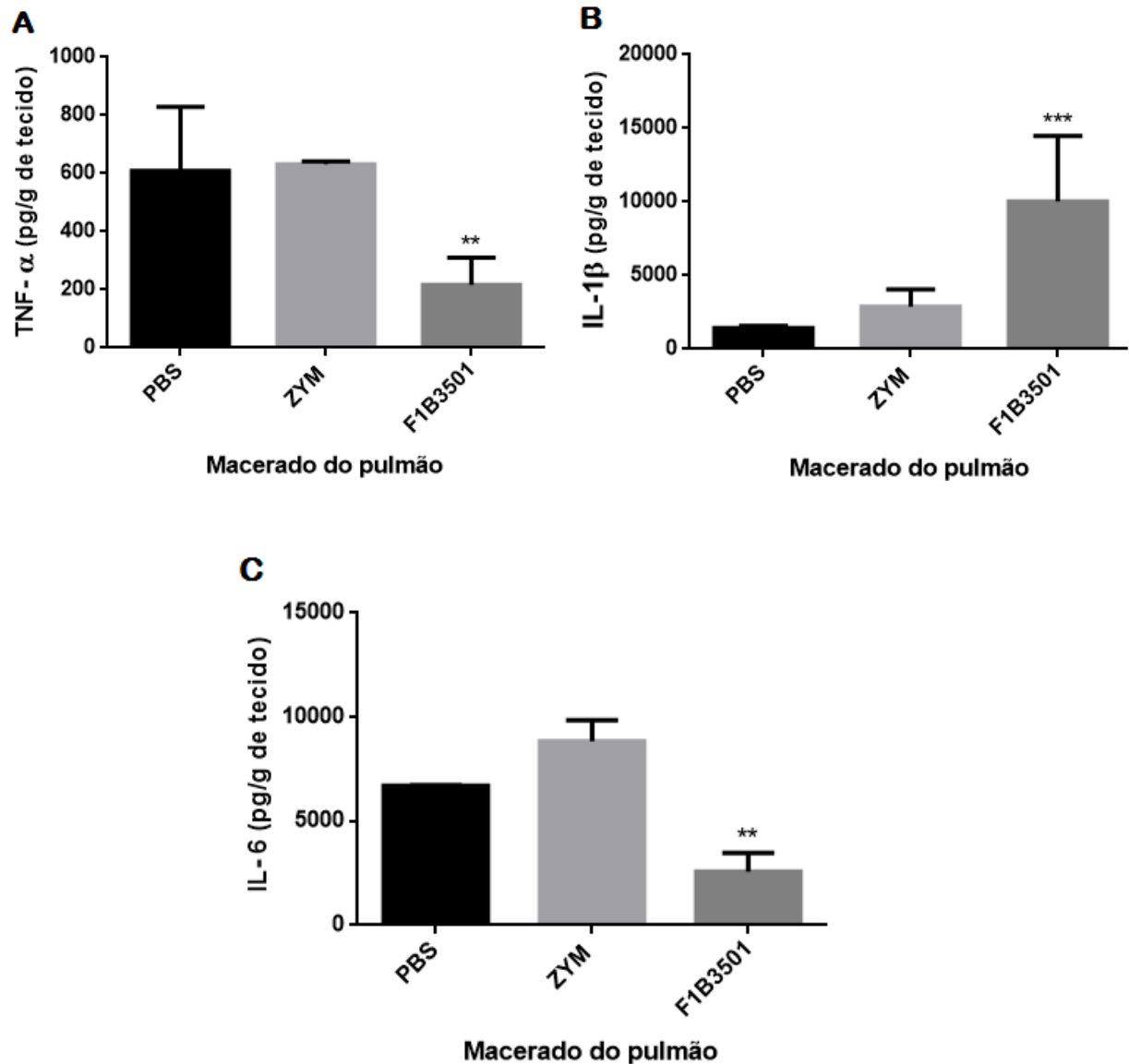


**Figura 10 – O estímulo com a fração F1B confere aos camundongos maior tempo de sobrevivência.** Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 (4 por grupo). O grupo PBS (controle) recebeu estímulo com solução tampão fosfato; o grupo ZYM e o grupo F1B3501 receberam estímulos de *Zymozan* e da fração FB3501, respectivamente, ambos na concentração de 37,5 µg/mL. Os estímulos foram realizados por via intranasal e no tempo de 24 horas antes da infecção. Após o período dos estímulos os animais foram infectados por via intratraqueal com  $1 \times 10^5$  de células de *C. neoformans* da linhagem H99. A sobrevivência dos camundongos foi acompanhada por 40 dias.

## **6. Dosagem das citocinas da resposta imune inata dos pulmões de camundongos**

Para compreender melhor os mecanismos imunológicos que estão ocorrendo no tecido dos animais tratados, com 15 dias após a infecção, os animais foram sacrificados e foi feita a retirada dos pulmões, seguido por maceração e centrifugação da amostra. O sobrenadante foi coletado e os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 foram mensurados.

Os animais que foram tratados com a fração FB apresentaram níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 menores quando comparados com o controle PBS e Zym, entretanto, o nível de IL-1 $\beta$  se mostrou aumentando quando em comparação com os demais grupos, conforme figura 11 A-C.



**Figura 11 – Dosagem de citocinas do macerado do pulmão de animais previamente estimulados a fração F1B e posteriormente infectados com a linhagem H99 de *C. neoformans*.** Camundongos da linhagem C57BL/6 (3 por grupo) foram previamente estimulados com PBS (controle), com *Zymozan* e com a fração FB3501 ambas na concentração de 37,5  $\mu$ g/mL, no tempo de 24 horas antes da infecção. Os estímulos foram realizados por via intranasal e no tempo de 24 horas antes da infecção. Após o período dos estímulos os animais foram infectados por via intratraqueal com  $1 \times 10^5$  de células de *C. neoformans* da linhagem H99. No tempo determinado de 15 dias, os animais foram sacrificados e os pulmões foram retirados, macerados e do sobrenadante foi dosado as citocinas (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$  e (C) IL-6.

## DISCUSSÃO

As  $\beta$ -glucanas são moléculas comumente extraídas de leveduras, fungos e bactérias com grande fator imunomodulatório. Diversos estudos tem voltado o foco para essa molécula, uma vez que, ela é capaz de ativar mecanismos imunes que são considerados protetores, tais como, a capacidade em aumentar a atividade antimicrobiana, funcional e a proliferação de células do sistema imune, além de serem capazes de induzir a produção de mediadores pró-inflamatórios como, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 via componentes do sistema complemento contra infecções virais, bacterianas e fúngicas (Silva *et al.*, 1994; Tzianabos, 2000; Sá-Nunes, 2004; Rappley e Goldman, 2006; Magnani *et al.*, 2008; Nóbrega *et al.*, 2010). Essa atividade das  $\beta$ -glucanas tornou-se algo promissor a ser pesquisado, uma vez que, é um excelente candidato à formulação ou composição de um novo método terapêutico contra as infecções fúngicas, que acometem, principalmente, os hospedeiros imunodeprimidos (Kuliche *et al.*, 1997). Na literatura já é descrito que a fração F1 de alguns fungos como *H. capsulatum*, *F. pedrosoi* e *C. albicans*, é composta, predominante, por  $\beta$ -1,3-glucana. Essas frações possuem atividade quimioatrativas, ativação de neutrófilos e macrófagos e a indução de TNF- $\alpha$  (Medeiros *et al.*, 2004; Rappley e Goldman, 2006; Sato *et al.*, 2006; Nóbrega *et al.*, 2010), corroborando assim com os nossos achados demonstrados na Figura 6A e 6B, na qual as frações da linhagens B3501 e *cap67* $\Delta$  foram capazes de induzir a ativação de macrófagos através da indução da referida citocina. Contudo, nos estudos realizados por Pelizon (2004) não foi identificada indução de citocinas inflamatórias em experimentos *in vitro* frente a estímulos com  $\beta$ -glucana derivado do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, semelhantemente ao ocorrido com a fração F1 derivada da linhagem H99 do fungo *C. neoformans* (Figura 6C). Esse resultado poderia ser justificado, em partes, talvez, pela presença abundante de outros componentes da parede celular, tal como a quitina que possui efeitos complexos além de ser reconhecida por outros receptores de superfície celular como o TLR-2 (Lee *et al.*, 2008).

As  $\beta$ -glucanas são considerados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e podem ser reconhecidas por receptores de reconhecimento padrão (PRR) presentes na superfície celular de diversas células, tanto células do sistema imune quanto de células não imune, como os fibroblastos e de células



endoteliais. Alguns receptores estão envolvidos no reconhecimento desse carboidrato, dentre eles, destacam-se dectina-1, receptor do complemento 3 (CR3; CD11b / CD18), receptores scavenger (SRs) e receptores tipo *Toll* (TLR). O receptor mais conhecido e com processos mais elucidados é a Dectina-1 que está, predominante, presente em neutrófilos, macrófagos, monócitos e células dendríticas, sendo influenciado por diversos produtos microbianos e ou citocinas (Brown e Gordon, 2001; Brown e Gordon, 2005). A dectina-1 é uma glicoproteína com uma região externa, sendo responsável pelo reconhecimento da fração F1, e outra região transmembranar, na qual, após ativação induz uma cascata de reações que inclui a fagocitose e a produção de superóxido por macrófagos como resposta de defesa aos estímulos recebidos (Brown e Gordon, 2001; Taylor, 2002).

Uns dos mecanismos microbicida envolvido na ativação dos macrófagos, com o objetivo de eliminar o patógeno e evitar a disseminação, é a produção de óxido nítrico (NO) e a fagocitose. O NO é uma molécula que, em organismos superiores, promove a nitrosilação e estresse oxidativo, inibindo a respiração mitocondrial, síntese de DNA e o transporte ativo na região membrana das células, ocasionando a morte do organismo invasor, incluindo contra os fungos *C. neoformans*, *C. albicans*, *P. brasiliensis* (Granger *et al.*, 1988, Vazquez-Torres *et al.*, 1995; Bocca *et al.*, 1998;)

A partir disso, avaliou-se a capacidade das frações estudadas neste trabalho em induzir a produção de NO. Conforme demonstrado na Figura 7, podemos verificar que a fração F1B e F1C são capazes de induzir a produção desse agente oxidativo. Além disso a fração F1B mostrou uma tendência da produção de NO numa relação dose-dependente confirmando os resultados descritos na revisão de Akramiene *et al.* (2007). Entretanto, a fração F1H não induziu taxas significativas do óxido nítrico, tal resultado já era esperado, uma vez que, nos demais experimentos, essa fração não apresentou atividade sobre os macrófagos. O segundo mecanismo avaliado foi a capacidade das frações em aumentar as taxas de fagocitose. Esse processo desempenha um papel importante na imunidade inata, pois, além de eliminar o patógeno promove, também, a ativação da imunidade adaptativa (Janeway e Medzhitov, 2002). Nossos resultados referente ao índice de fagocitose demonstraram que no tempo inicial de 6 horas apenas o grupo estimulado com a fração F1B, na concentração de 50 µg/mL, obteve índices baixos (Figura 8A). Porém no tempo de 12 horas (Figura 8B), um aumento no número de leveduras fagocitadas

e viáveis em todos os grupos, com exceção do grupo estimulado com a fração F1B na concentração de 37,5 µg/mL, na qual quantidade de leveduras internalizadas e viáveis foi, aparentemente, menor em comparação com o controle negativo. Além disso, fazendo uma análise sobreposta dos dois dados, o grupo estimulado com a fração da linhagem B3501 parece manter um patamar. Nos estudos realizados por Jang *et al.* (2009) foi verificado que beta-glucanas derivadas de outro fungo induziram significativamente o processo de fagocitose em macrófagos de linhagem, e já Fuentes *et al.* (2011) mostraram a importância da participação desse carboidrato como importante indutor do processo em células não ativadas. Esses dados em conjunto sugerem que, a fração F1B apresenta ação fungicida/fungistática melhor que as demais, necessitando de uma melhor análise para a definição da ação dessa beta-glucana.

Outro aspecto avaliado foi a viabilidade celular (Figura 9 A-D). O polissacarídeo F1B e F1H não alterou a viabilidade celular em diferentes concentrações corroborando com os achados de Harnack *et al.*, (2011), em que beta-glucanas derivadas de levedura não diminuem a viabilidade em células de linhagens, por período superior a 72 horas de estímulo e em concentrações de até 100µg/mL. Entretanto, o fato da fração F1H não alterar a viabilidade celular pode estar diretamente relacionado a falta de indução de uma atividade estimulatória ou devida a presença de componentes distintos do estudado que podem regular o SI de outra forma e por outras vias não avaliada nesse trabalho. Já a fração F1C apresentou uma diminuição significativa da viabilidade celular com estímulos de todas concentrações. O motivo pelo qual isso não ocorreu não está claro sendo necessário uma melhor investigação.

Até o momento, o polissacarídeo derivado da linhagem B3501 do fungo *C. neoformans* foi o que apresentou melhores resultados na ativação celular, na indução de NO, na fagocitose e não demonstrou possuir efeito citotóxico sobre os fagócitos. Então, a fração FB3501 na concentração de 37,5 µg/mL foi escolhida para verificar se seria capaz de alterar a sobrevivência dos animais pré-expostos e infectados.

Na curva de sobrevivência (Figura 10) nota-se que o estímulo prévio com a fração proporcionou uma sobrevivência dos camundongos duas vezes maior que em relação ao grupo controle, sugerindo, talvez, que essa beta-glucana consiga modular a resposta imune do hospedeiro promovendo uma proteção contra a infecção. Esse

achado corrobora com os estudos realizados por Mansour *et al.* (2004), os quais se verificou maior sobrevida no experimento *in vivo* após estímulos com frações derivadas do fungo *C. neoformans*.

Para melhor entender as modificações ocasionadas por essa glucana, realizou-se a dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  do macerado do pulmão do ensaio *in vivo* (Figura 11 A-C). Nota-se que as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 (Figura 11A e 11B) se apresentam em níveis reduzidos em relação ao controle; e somente a citocina IL-1 $\beta$  (Figura 11C) apresentou-se aumentada. Nos estudos de Mansour *et al.* (2004), foi observado que os níveis de TNF- $\alpha$  do pulmão de camundongos não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, contrariando assim o resultado encontrado nesse trabalho, no qual essa referida citocina apresentou-se significativamente reduzida. Na revisão de estudos realizado por Kim *et al.*, (2006), demonstrou que em algumas pesquisas realizadas com seres humanos e animais a secreção de IL-1 $\beta$  estava aumentada, confirmando com os nossos achados. No entanto, nessa revisão os níveis de TNF- $\alpha$  também estavam aumentados.

Ainda não se sabe ao certo os motivos da divergência dos nossos achados com a literatura, contudo, podemos sugerir que a diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 esteja relacionada com uma resposta mais coordenada decorrente do estímulo pela fração, de forma a modular o sistema imune do hospedeiro a evitar uma resposta inflamatória intensa. Essa inferência concordaria com os dados obtidos para IL-1 $\beta$ , visto que a secreção dessa citocina é altamente regulada e com grande potencial em induzir uma resposta imune inflamatória exacerbada, interferindo assim na capacidade do organismo em eliminar o patógeno sem maiores danos ao hospedeiro.

## CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que os componentes da parede celular de *C. neoformans* da linhagem B3501 são capazes de estimular a resposta imunitária do hospedeiro, resultando no aumento de algumas atividades da imunidade do hospedeiro; sendo, portanto, novos estudos aprofundados para explorar as diversas possibilidades terapêuticas proporcionada por essa fração.

## REFERÊNCIA

Akramiene, D.; *et al.*. Effects of beta-glucans on the immune system. Medicina, Kaunas. v. 43, n. 8, p. 597-606. Aug. 2007.

Almeida, SR. 2008. Micologia. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

Alvarez, M.; Casadevall, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. Current Biology, 7:2161-5, 2006.

Baker, R. D., and R. K. Haugen. 1955. Tissue changes and tissue diagnosis in cryptococcosis: a study of twenty-six cases. Am. J. Clin. Pathol. 25:14– 24.

Barnett JA. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. Yeast. 2010; 27:875–904. [PubMed: 20641025].

Bartinick-Garcia, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annual Review of Microbiology. v-22, p. 87-108, 1968.

Bocca A. L., Hayashi E. E., Furlanetto A. B., Campanelli A. P., Cunha F. Q., Figueiredo F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with the nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. J. Immunol., 161(6), 3056-3063, Sep 15, 1998.

Brown, G. D. (2011). Innate Antifungal Immunity : The Key Role of Phagocytes. Annual Review of Immunology, 29, 1–21. doi:10.1146/annurev-immunol-030409- 101229. INNATE.

Brown, G. D.; Gordon, S. A new receptor for  $\beta$ -glucans. Nature, London, v. 413, n. 1, p. 36-36, 2001.

Brown, G. D.; Gordon, S.. Immune recognition of fungal. *Cellular Microbiology*, Oxford, v. 7, n. 4, p. 471-479, 2005.

Brunke S, Mogavero S, Kasper L, Hube B. (2016). Virulence factors in fungal pathogens of man. *Current Opinion in Microbiology* 32, 89-95. (Review).

Busse O. Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Zuchtung. *Centralbl. Bakt. Parasit.* 1894; 16: 175-180.

Casadevall A (2007) Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biol Rev.* 21:130–132.

Casadevall A. Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal Genet.Biol* 2005;42:98–106. [PubMed: 15670708].

Casadevall, A, Perfect, JR. 1998. *Cryptococcus neoformans: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. ASM Press.

Cassone A & Casadevall A. Recent progress in vaccines against fungal disease. *Current Opin Microbiol.* 15: 1-7.2012.

Chakrabarti, A. 2005. Microbiology of systemic fungal infections. *J Postgrad Med* 51 Suppl 1: S16-20.

Charlier C, Chretien F, Baudrimont M, Mordelet E, Lortholary O, Dromer F. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *The American Journal of Pathology.* 2005; 166:421–32. [PubMed: 15681826].

Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(3):507-44, v-vi.

Chen SH, Stins MF, Huang SH, Chen YH, Kwon-Chung KJ, Chang Y, Kim KS, Suzuki K, Jong AY. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Medical Microbiology*. 2003; 52:961–70. [PubMed: 14532340].

Doering TL. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Microbiology*. 2009; 63:223–47.

Erwig L. P., Gow N. A. (2016). Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 163–176. 10.1038/nrmicro.2015.21.

Faganello, J.; Arruda, W.; Schrank, A. & Vainstein, M. H. An alternative method to prepare samples of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* for scanning electron microscopy analyses. *J Microbiol Methods*, 64(3):416-419, 2006.

Faguy, D. M. 2011. Fungal pathogens: an overview. *Radiol Technol* 82: 321-40.

Fuentes AL, Millis L, Sigola LB. Laminarin, a soluble betaglucan, inhibits macrophage phagocytosis of zymosan but has no effect on lipopolysaccharide mediated augmentation of phagocytosis. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(11):1939-1945.

Granger D.L., Hibbs J. B. Jr., Perfect J.R., Durack D.T. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbistatic activity of murine macrophage. *J.Clin.Invest*, 81(4), 1129- 1136, Apr, 1988.

Green L. C., Wagner D. A., Ruiz de Luzureaga K., Istfan N., Young V.R., Tannenbaum S. R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 78 (12), 7764-8, Dec, 1981.

Hardison SE, Brown GD. 2012. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol* 13: 817-22.

Harnack, U. et al. (2011) Yeast-derived Beta-(1-3),(1-6)-D-glucan Induces Up-regulation of CD86 on Dectin-1-positive Human B-Lymphoma Cell Lines. *Anticancer Res.* 31: 4195-9.

Hawksworth, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*, v. 95, p. 641-645, 1991.

Hawksworth, D. L.. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies In Mycology, Madrid*, v. 50, p.9-18, 27, 2004.

Idnurm A, Bahn Y, Nielsen K, Lin X, Fraser JA 2005. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology* 3: 753- 764.

Janbon G. 2004. Mini Review *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Research* 4: 765-777.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Rev Immunol*, v.20, p.197-216, 2002.

Jang, S.A., S. Park, J.D. Lim, C.H. Kang, K.H. Yang, S. Pyo and E.H. Sohn. 2009. The comparative immunomodulatory effects of  $\beta$ -glucans from yeast, bacteria, and mushroom on the function of macrophages. *J. Food Sci. Nutr.* 14:102-108.

Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik M., Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 56: 211-24, 2009.



Kim, S. Y.; Song, H. J.; LEE, Y. Y.; Cho, K. H.; Roh, Y. K. Biomedical Issues of Dietary fiber Beta-Glucan. *Journal of Korean medical science*, v. 21, n. 1, p. 781- 789, 2006.

Kristóf, Z.; Bóka, K.; Vági, P.; Preininger, E.; Kovács, G. M.; Böddi, B. *Structure of plants and Fungi*. Hungary. ELTE.2013.

Kronstad, J. W.; Attarian, R.; Cadieux, B.; Choi, J.; D'Souza, C. A.; Griffiths, E. J.; Geddes, J. M. H.; Hu, G.; Jung, W. H.; Kretschmer, M.; Saikia, S.; Wang, J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews*, v. 9, p. 193-203, 2011.

Kulicke, W.-M.; Lettau, A. L.; Thielking, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1-3)  $\beta$ -D-glucans. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 297, n. 2, p. 135-143, 1997.

Kurowaka, C. S.; Sugizaki, M. F., Peracoli, M. T. S. Virulence Factors in Fungi of Systemic Mycoses. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* [online]. 1998, vol.40, n.3, pp.125-136. ISSN 1678-9946. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651998000300001>.

Kwon-Chung, K. J.; Varma, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res*, v. 6, n. 4, p. 574-87, 2006.

Lee C.G., Da Silva C.A., Lee J.Y., Hartl D., Elias J.A. 2008. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Current Opinion in Immunology*, 20, 684–689. DOI:10.1016/j.coi.2008.10.002.

Levinson, W. *Review of Medical, Microbiology and Immunology*. 13<sup>th</sup> ed. New York. McGraw-Hill Medical. 2014. ISBN: 978-0-07-181812-4.

Levitz SM. 2010. Innate recognition of fungal cell walls. *PLoS Pathog* 6: e1000758. doi: 10.1371/journal.ppat.1000758. PMID: 20421940.

Lin X, Heitman J. 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 60: 69-105.

Lin, X. (2009). *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(4), 401–16. doi:10.1016/j.meegid.2009.01.013.

Litvintseva AP, Marra RE, Nielsen K, Heitman J, Vilgalys R, Mitchell TG. 2003. Evidence of sexual recombination among *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates in sub-Saharan Africa. *Eukaryot Cell* 2: 1162-8.

Luberto C., Martinez-Marino B., Taraskiewicz D., Bolanos B., Chitano P., Toffaletti D. L., Cox G. M., Perfect J. R., Hannun Y. A., Balish E., Del Poeta M. (2003). Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Invest.* 112, 1080–1094. doi:10.1172/JCI18309.

Lutz, M. B.; Kukutsch, N.; O, Gilvie, A. L. J.; Rossne, S.; Koch, F.; Romani, N.; Schuler, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Meth.*, v. 223, n. 1, p. 77–92, 1999.

Ma H, Croudace JE, Lammas DA, May RC. Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. *Curr Biol.* 2006; 16:2156–60. [PubMed: 17084701].

Ma, H.; May, R. C. Virulence in *Cryptococcus* Species. In: LASKIN, A. I.; SARIASLANI, S.; GADD, G. M. editors: *Adv. in App. Microb.*, v. 67, Burlington: Academic Press, p. 131-190, 2009.

Magnani, M., Castro Gomez, R.J.H.  $\beta$ -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constituição, bioatividade e obtenção. *Semina: Ciências Agrárias*, v.29, n.3, p.631-650, 2008.

Mansour MK, Yauch LE, Rottman JB, Levitz SM. Protective efficacy of antigenic fractions in mouse models of cryptococcosis. *Infect Immun*. 2004 Mar; 72(3):1746-54.

Marim FM, Silveira TN, Lima DS, Jr., Zamboni DS. 2010. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One* 5:e15263.

McFadden DC, De Jesus M, Casadevall A. 2006. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J Biol Chem* 281: 1868-75.

Medeiros A. I., Malheiros A., Jose P. J., Conroy D. M., Williams T. J., Faccioli L. H. Differential release of MIP-1 alpha and eotaxin during infection of mice by *Histoplasma capsulatum* or inoculation of beta-glucan. *Inflammation Reseach*, 53, 351-54, Mar, 2004.

Mendes-Giannini, M. J. S.; Andreotti, P. F.; Da Silva, J. L.; Lenzi, H. L.; Benard, G.; Zancopé-Oliveira, R.; De MATOS GUEDES, H. L.; Sares, C. P. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.*, v. 8, n. 6, p. 1550-1559, 2006.

Mitchell, T.G., Perfect, J.R. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 8: 515-48.

Nóbrega YK, Lozano VF, Araújo TS, de Carvalho DD, Bocca AL. The Cell Wall Fraction from *Fonsecaea pedrosoi* Stimulates Production of Different Profiles of Cytokines and Nitric Oxide by Murine Peritoneal Cells In Vitro. *Mycopathologia*. 2010, 170:89–98. doi:10.1007/s11046-010-9303-8.

Pappalardo MC, Melhem MS. 2003. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 45: 299-305.

Park BJ; Wannemuehler KA; Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23: 525-30.

Pelizon, A. C., Kaneno, R., Soares, A. M. V. C., Meira, D. A., & Sartori, A. (2005). Immunomodulatory activities associated with  $\beta$ -glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiological Research*, 54(5), 557-564. PMID:16238470.

Perfect, J. R.; *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 463-488. 2006.

Queiroz JPAF, Sousa FDN, Lage RA, Izael MA, Santos AG. *Criptococose - uma revisão bibliográfica*. *Acta Vet Bras* 2008; 2(2): 32-38.

Rappleye C. A., Goldman W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 281-303, 2006.

Reese AJ, Yoneda A, Breger JA, Beauvais A, Liu H, et al. 2007. Loss of cell wall  $\alpha(1-3)$  glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Mol. Microbiol.* 63:1385–98.

Reid DM, Gow NA, Brown GD. 2009. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol* 21: 30-7.

Robbins & Cotran – *Patologia: Bases Patológicas das Doenças*, 9ª ed., Elsevier, 2016. ISBN: 978-85352-8163-7. ISBN (versão eletrônica): 978-85-352-5577-5.

Romani, L. 2011. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 11: 275-88

Sa-Nunes A., Medeiros A. I., Faccioli L. H. (2004). Interleukin-5 mediates peritoneal eosinophilia induced by the F1 cell wall fraction of *Histoplasma capsulatum*. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, 37(3):343-6.

Sato T., Iwabuchi K., Nagaoka I., Adachi Y., Ohno N., Tamura H., Seyama K., Fukuchi Y., Nakayama H., Yoshizaki F., Takamori K., Ogawa H. Induction of human neutrophil chemotaxis by *Candida albicans*-derived beta-1,6-long glycoside side-chain-branched beta- glucan. *Journal Leukocyte Biology*, 80, 204-11, Jul, 2006.

Schop J. Protective Immunity against *Cryptococcus neoformans* infection. 2007. *McGill Journal of Medicine* 10(1):35-43.

Silva C. L.; Fazioli R. A. Role of the fungal cell wall in the granulomatous response of mice to the agents of chromomycosis. *Journal Med. Microbiol.*, 20(3), 299-305, Dec, 1985.

Silva CL, Alves LM, Figueiredo F. (1994). Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology* 140 ( Pt 5):1189-94.

Silva, B.K.; Freire, A.K.; Bentes, A.S.; Sampaio, I.L, Santos, L.O.; Santos, M.S.; Souza, J.V. Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans* – *Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. *Revista Iberoamericana de Micología*, Barcelona, v.29, n.1, p.40-43, jan.-mar. 2012.

Srikanta D, Santiago-Tirado FH, Doering TL. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*. 2014;31(2):47-60.

Taylor, P. R.; Brown, G. D.; Reid, D. M.; Willment, J.A.; Martinez Pomares, L.; Gordon, S.; Wong, S. Y. The  $\beta$ -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 169, n. 7, p. 3876-3882, 2002.

Tzianabos, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.13, n. 4, p. 523-533, 2000.

Vazquez-Torres A, Jones-Carson J., Balish E. Nitric oxide production does not directly increase macrophage candidacidal activity. *Infect. Immun.*, 63(3), 1142-4, Mar, 1995.

Zaragoza O, Nielsen K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Current Opinion in Microbiology*. 2013.

Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol* 68: 133-216.

Zaragoza, O.; Fries, B. C & Casadevall, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO<sub>2</sub>. *Infect Immun*, 71(11):6155-6164, 2003.

Zhang, X., Gonçalves, R., & Mosser, D. M. 2008. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology*, 14(1), 1–18. doi:10.1002/0471142735.im1401s83.